

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

**Papel del TCR en el desarrollo y función de los
linfocitos $T\gamma\delta$ efectores**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Miguel Muñoz Ruiz

DIRECTORES

**José R. Regueiro
Edgar Fernández Malavé
Bruno Silva-Santos**

Madrid, 2017



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE QUÍMICAS

TESIS DOCTORAL
**PAPEL DEL TCR EN EL DESARROLLO
Y FUNCIÓN DE LOS LINFOCITOS $T\gamma\delta$
EFECTORES**

Miguel Muñoz Ruiz
Madrid, 2016

Dr. José R. Regueiro
Dr. Edgar Fernández Malavé
Dr. Bruno Silva-Santos

TESIS DOCTORAL
**PAPEL DEL TCR EN EL DESARROLLO Y FUNCIÓN DE LOS
LINFOCITOS T γ δ EFECTORES.**

Esta memoria ha sido presentada por el licenciado Miguel Muñoz Ruiz para optar al grado de Doctor por el programa de doctorado de Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina (RD1393/2007)

Directores de la tesis:

Dr. José R. Regueiro y Dr. Edgar Fernández Malavé

Dpto. Microbiología I (Área Inmunología)

Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital 12 de Octubre

Facultad de Medicina

Universidad Complutense de Madrid

Dr. Bruno Silva-Santos

Lab. T cell Differentiation & Tumor Targeting

Instituto de Medicina Molecular

Universidade de Lisboa

Este trabajo ha sido realizado en el Dpto. Microbiología I (Área Inmunología) y financiado por una Beca del Programa de Formación de Personal Investigador de la Universidad Complutense (2011) y por los proyectos de investigación CAM S2010/BMD-2316, MINECO SAF2011-24235, LAIR 2012/0070 y FIS PI11/02198.

A mis padres y Trini por guiarme en este camino
A los que ya no están y recuerdo con cariño infinito (Paco, Dolores, Carletes)



Por fin llegó el momento de poner punto final a una etapa maravillosa y muy dura. He aprendido de cada momento y persona con la que me he cruzado en este camino, he disfrutado lo máximo posible de cada uno de vosotros; hay mucha gente que ha sido partícipe de este trabajo y no lo sabe. Incluso los que no conocen la inmunología tienen un trocito de esta historia.

En primer lugar gracias al Dr. JR Regueiro, mi director de tesis original, clave en todo este trabajo, incluso cuando yo pensaba justo lo contrario. La perspectiva del tiempo me ha permitido ver que es la persona que mejor sabe dar las herramientas para poder desarrollar lo que uno lleva dentro. Confío en mí cuando era difícil hacerlo y puso en mi mano todo lo necesario para llegar a este punto final.

En segundo lugar no puedo olvidarme del Dr. Fernández-Malavé, al que ya considero un amigo. Podemos decirnos lo bueno y lo malo sin ningún problema, porque sé que hasta las formas más bruscas son por mi bien. Tu ayuda en todas las fases de este trabajo ha sido básica. No tengo duda de que habrá alguna que otra publicación juntos, así que ¡nos vemos en revisión!

Y el último en unirse a este elenco de directores, el Dr. Bruno Silva-Santos, para el que sólo tengo palabras de agradecimiento. Porque ha conseguido que mi vida laboral de un vuelco increíble, porque me dio la oportunidad de trabajar en unos de los mejores laboratorios del mundo, porque me enseñó cómo quiero hacer ciencia de mayor y porque me entendió en lo personal siempre. Sólo puedo decir que fue un auténtico placer ser un BSS.

Después de noches interminables en la poyata, me llevo un ramillete de amigos de los que me siento orgulloso de presumir, empezando por mi “compi” de Madrid, Bea, a la que echo de menos cada vez que veo una pipeta y más ahora que cada uno está en una punta del mundo. A todo “celular”, Dani, Marina, Vero, Anaïs, Ana, Miriam y los de mi quinta, Juan y Carmen, sin olvidarme de Rocío y Patricia. De Lisboa me llevo el mejor laboratorio y grupo de personas con las que podré trabajar, es irreplicable. La pena que sentí cuando dejé el laboratorio es la mejor prueba de ello. Desde Pappoto, Ribot, Tiago, Sergio, Natacha, Francisco, Nina, Hiro, Sofía, Ana Amorin, hasta el propio Bruno... *miss you guys!*

Solo puedo agradecer a Juan José Silva todo lo que me ha ayudado este tiempo, hemos caminado juntos con miles de obstáculos que superar y miles historias que contar, allí donde estuviera sabía que tenía una voz sensata para aconsejarme siempre. Gracias “J” por ayudarme a ir paso a paso. No puedo olvidarme de Pablo Povedano, otro pilar fundamental para mantenerme de pie en todo momento, la persona que me aguantó siempre, el amigo al que le robé miles de cervezas y nunca puso una pega, todo lo contrario, “clase *Premium*”. Y si me acuerdo de Pablo tengo que acordarme del gran descubrimiento de Nuria: mil gracias. Tampoco puedo olvidar a mi Pedrito, mi “compi” de clase en la Universidad al que todavía le sigo dando la lata con mis historias y que sorprendentemente sigue aguantando con paciencia. Prepárate porque te quedan otros tantos añitos, ¡gracias! Un trozo muy grande de esta tesis es vuestra, me siento afortunado y orgulloso de teneros como amigos.

No puedo olvidarme de la gente del “Chami” (el mejor colegio mayor del mundo), de la gente de Sainz de Baranda (el mejor piso compartido que ha existido nunca), de la gente de “AC Caló” (el mejor equipo de fútbol de la historia) y de toda esa gente de Córdoba que se ha portado genial conmigo durante todo este tiempo. A Tere Ciudad y los “mellis”. No sabéis la suerte que tengo.

Quería tener un recuerdo especial para quién fue capaz de hacer del defecto virtud, de la pérdida ganancia y siempre me demuestra un cariño infinito. Mil besos Laura, va por los 3!

Cómo no podría ser de otra forma, agradezco a mi familia colocarme donde me han colocado, porque sin su apoyo diario nada de esto hubiera sido posible, a mis tíos de Córdoba y mi primo Pablo, que sin saberlo cada partida de FIFA que le ganaba me daba fuerzas para seguir. A mi familia de Madrid, todos mis tíos y todos mis primos que han sido un soporte básico desde que me vine a vivir a esta ciudad tan maravillosa, Madrid.

Por último y más importante, a mis padres. Ellos conocen cada paso de este camino y por eso lo valoran el doble, yo desde aquí solo puedo agradecer todo el apoyo y haceros saber que 3/4 de la tesis es vuestra... ¡LO HEMOS LOGRADO!



00 /

ÍNDICE



	<i>Página</i>
01 / RESUMEN	15
02 / SUMMARY	23
03 / ABREVIATURAS	29
04/ INTRODUCCIÓN	33
1. LINFOCITOS T Y SUS RECEPTORES DE ANTÍGENO	35
2. LINFOCITOS T $\gamma\delta$	36
2.1. Compromiso de linaje T $\gamma\delta$ vs T $\alpha\beta$	37
2.2. Diferenciación de las células T $\gamma\delta$ efectoras en el timo (IFN- γ vs IL-17)	37
2.2.1. Diferenciación dependiente de TCR	38
2.2.2. Diferenciación independiente de TCR	41
2.2.3. Ondas de diferenciación tímica vs destino T $\gamma\delta$ efector	42
3. LINFOCITOS T $\gamma\delta$ EN LOS RATONES DEFICIENTES DE CD3 γ y CD3 δ	43
3.1. Deficiencia absoluta de <i>Cd3</i>	43
3.2. Haploinsuficiencia de <i>Cd3</i>	44
05 / OBJETIVOS	47
06 / MATERIALES Y METODOS	51
1. MATERIALES	53
1.1. Modelos animales	53
1.1.1. Haploinsuficiencia simple de <i>Cd3</i> (SH)	53
1.1.2. Haploinsuficiencia combinada de <i>Cd3</i> (CD3DH)	53
1.1.3. Embriones (embarazos programados)	53
1.1.4. Quimeras de médula ósea	54
1.2. Células	54
1.3. Aparatos, consumibles y kits	54
1.4. Anticuerpos	55
1.5. Otros reactivos	56
1.6. Medios, tampones y soluciones	56
1.7. Herramientas informáticas	61
2. MÉTODOS	59
2.1. Biología celular <i>ex vivo</i>	59
2.1.1. Aislamiento de órganos	59
2.1.2. Citometría de flujo y aislamiento celular	59
2.1.3. Análisis funcional	59
2.1.3.1. Producción de citoquinas	59
2.1.3.2. Eventos de activación celular	60
2.1.3.3. Polarización Th1	60
2.1.4. Desarrollo <i>in vitro</i> (en el sistema OP9-DL1)	60
2.2. Biología molecular	61
2.2.1. PCR en tiempo real	61

2.2.2. <i>Microarrays</i>	61
2.3. Modelos <i>in vivo</i>	61
2.3.1. Infección por malaria	61
2.3.2. Tratamiento con anticuerpo anti-CD3 <i>in vivo</i>	62
2.4. Bioquímica	62
2.4.1. Lisados celulares	62
2.4.2. Western Blot	62
2.4.3. Evaluación de la cadena CD3δ en la superficie celular	62
2.5. Análisis estadístico	62
07 / RESULTADOS	63
1. DESARROLLO TÍMICO DEL LINAJE Tγδ EN RATONES CD3DH	65
1.1. Reducción selectiva de la expresión del TCRγδ y del número de timocitos Tγδ	65
1.2. Impacto de deficiencia absoluta o parcial de CD3δ en la expresión del TCRγδ	67
1.2.1. Expresión del TCRγδ en el timo	67
1.2.1.1. Expresión extracelular de CD3δ	67
1.2.1.2. Expresión intracelular de CD3δ	68
1.3. Reducción de la señalización vía TCRγδ	69
1.4. Reconstitución competitiva (defecto intrínseco)	70
2. DESARROLLO DIFERENCIAL DE LOS TIMOCITOS Tγδ EFECTORES EN RATONES CD3DH	72
2.1. Análisis <i>ex vivo</i>	72
2.1.1. Análisis de timocitos IFN-γ ⁺ e IL-17 ⁺ y su repertorio Vγ	73
2.2. Análisis <i>in vitro</i>	74
2.2.1. Sistema OP9-DL1	74
3. IMPRONTA TRANSCRIPCIONAL DE LOS TIMOCITOS Tγδ EN RATONES CD3DH	76
3.1. Expresión génica durante la ontogenia	76
3.2. Validación de genes candidatos tras la estimulación vía TCR	77
4. AUSENCIA DE TIMOCITOS Tγδ IFN-γ ⁺ CD122 ⁺ NK1.1 ⁺ EN RATONES CD3DH	79
4.1. Ausencia de la sub-población Tγδ CD27 ⁺ CD122 ⁺ NK1.1 ⁺ <i>in vivo</i>	79
4.2. Caracterización de la sub-población Tγδ CD27 ⁺ CD122 ⁺ NK1.1 ⁺	79
4.3. Restablecimiento de la sub-población Tγδ CD27 ⁺ CD122 ⁺ NK1.1 ⁺ en ratones CD3DH	80
4.4. Quimeras de médula ósea	81
5. DEFECTO EN LAS CÉLULAS Tγδ IFN-γ ⁺ PERIFÉRICAS EN RATONES CD3DH	83
5.1. Ausencia de la población Tγδ CD27 ⁺ CD122 ⁺ NK1.1 ⁺ <i>in vivo</i>	83
5.2. Quimeras de médula ósea	84
5.3. Modelo <i>in vivo</i> : Resistencia a malaria cerebral experimental	85
08/ DISCUSIÓN	87
1. VENTAJAS DEL MODELO CD3DH	89
2. POSIBLE MECANISMO	90
3. EFECTOS SELECTIVOS DE LINAJE	91
4. EFECTOS SELECTIVOS DE REPERTORIO	91
5. MECANISMO INTRÍNSECO (QUIMERAS)	92

6. REVERSIÓN DEL DEFECTO	93
7. EFECTOS EMBRION VS ADULTO	94
8. IMPRONTA TRANSCRIPCIONAL	97
9. IMPACTO FISIOPATOLÓGICO	98
9/ CONCLUSIONS	99
10 / BIBLIOGRAFÍA	103
11 / ANEXOS	115
1. PUBLICACIONES RELEVANTES	117

RESUMEN



INTRODUCCIÓN

Las células $T\gamma\delta$ se han revelado en los últimos tiempos como un tipo celular básico dentro del sistema inmunológico innato y adaptativo por su capacidad para producir citoquinas a diferentes tiempos y a la posibilidad de actuar contra distintos agentes infecciosos como virus, bacterias, parásitos o incluso contra células tumorales. Las distintas subpoblaciones de linfocitos $T\gamma\delta$ con capacidad de producir $IFN-\gamma$ o IL-17 principalmente, se generan en el timo de ratón, pero los estados de maduración o señales que dirigen y controlan este proceso de diferenciación no se conocen con exactitud.

En este contexto, el TCR parece ser clave para entender el desarrollo de estos linfocitos $T\gamma\delta$. Se acepta, gracias a diferentes estudios, que las células que reciben una intensidad de señal fuerte a través del TCR son aquellas que tendrán capacidad para producir $IFN-\gamma$, mientras que las células que producen IL-17 emergerán por “defecto” durante el desarrollo tímico recibiendo únicamente una señal débil a través del TCR. Sin embargo, este modelo ha sido discutido en los últimos dos años, pues se ha descrito que las células $T\gamma\delta$ del ratón SKG (ratón con una mutación hipomórfica en ZAP-70 que reduce en torno al 90% la capacidad de señalización vía TCR) mantienen intacta su capacidad para producir $IFN-\gamma$. No obstante, sí ven afectada la producción de IL-17 (tanto en timo como en periferia). Además otros artículos relacionaron el cambio conformacional del TCR tras activación con el desarrollo de algunas células $T\gamma\delta$ productoras de IL-17. En este punto, nos planteamos abordar esta cuestión desde una perspectiva diferente: disminuir la cantidad de $TCR\gamma\delta$ en la superficie celular con el fin de interferir su señalización *in vivo*. Para ello, se generaron y analizaron ratones portadores de mutaciones que afectaban la expresión de $CD3\gamma$, $CD3\delta$ y $CD3\epsilon$, sin observarse diferencias significativas comparando con ratones control. Sin embargo, cuando se analizó un ratón con haploinsuficiencia simultánea para *Cd3g* y *Cd3d* ($CD3DH$, por Haploinsuficiencia Doble de *Cd3*), se pudo comprobar cómo efectivamente la expresión del $TCR\gamma\delta$ en superficie se encontraba disminuida, pero no la del $TCR\alpha\beta$. Por lo tanto, se consideró que este ratón (la menor expresión del $TCR\gamma\delta$ en superficie también implica una menor capacidad de señalización) podría ser una herramienta útil para entender el papel que juega la intensidad de la señal del TCR en el desarrollo de las distintas subpoblaciones efectoras de células $T\gamma\delta$ en el timo. Cabe destacar que este modelo de ratón permite abordar esta pregunta sobre el repertorio total de linfocitos $T\gamma\delta$ (policlonal) y no desde un abordaje monoclonal (ratones transgénicos que expresan un único TCR), como se había descrito en la mayoría de los trabajos relacionados con el tema.

OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es la interferencia *in vivo* de la señalización vía $TCR\gamma\delta$ para intentar entender el papel que juega el TCR en el desarrollo de los linfocitos $T\gamma\delta$ efectoras, a través del análisis fenotípico y fisiopatológico de un modelo de ratón con haploinsuficiencia combinada de *Cd3g* y *Cd3d* ($CD3DH$).

Se analizará la capacidad de señalización del $TCR\gamma\delta$ en los timocitos $CD3DH$, punto crítico para poder estudiar el efecto de la intensidad de la señal sobre las distintas subpoblaciones efectoras $T\gamma\delta$. Posteriormente, se analizarán los posibles defectos que genera la reducción de la señal vía TCR en las distintas subpoblaciones de células $T\gamma\delta$ efectoras ($IFN-\gamma$ vs IL-17). Conjuntamente, se estudiarán los genes implicados en el proceso de desarrollo de las células $T\gamma\delta$. Una vez caracterizados todos los aspectos fenotípicos del ratón $CD3DH$, se utilizará un modelo relevante de enfermedad que permita poner en relieve la ausencia de células $T\gamma\delta$ en nuestros ratones.

También, se analizará si el aumento de la intensidad de la señal vía TCR $\gamma\delta$, a través de la administración de anticuerpo anti-CD3, permite la generación de células T $\gamma\delta$ en los ratones CD3DH, con el objetivo de conocer cuál es el origen del defecto en este modelo animal.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para estudiar el papel que juegan el TCR y su señal transmitida en el desarrollo de las células T $\gamma\delta$, se generó un ratón con una menor expresión del TCR $\gamma\delta$ en superficie como consecuencia de la reducción simultánea en la abundancia relativa de las cadenas CD3 δ y CD3 γ del receptor. Este modelo animal tiene un defecto selectivo en las células T $\gamma\delta$: la expresión del TCR en membrana, la intensidad de la señal generada por el mismo y el número total de células. El ratón CD3DH presenta timocitos T $\alpha\beta$ normales (incluyendo aquellos que dependen de selección agonista fuerte durante su desarrollo en el timo), pero una alteración en la diferenciación fetal de las células T $\gamma\delta$ productoras de IL-17 que son mayoritariamente V γ 6⁺ (este defecto no se encontró en el timo adulto, donde las células T $\gamma\delta$ productoras de IL-17 son mayoritariamente V γ 4⁺). También se puede observar en estos ratones una reducción severa durante la ontogenia y estado adulto de las células T $\gamma\delta$ CD27⁺ CD122⁺ NK1.1⁺, productoras de IFN- γ . Esta depleción selectiva tiene como consecuencia en el ratón adulto CD3DH una reducción del compartimento T $\gamma\delta$ IFN- γ ⁺ periférico, resultando en un aumento de la resistencia a malaria cerebral experimental, que es dependiente del IFN- γ proveniente de linfocitos T $\gamma\delta$. Esta población necesita una intensidad de la señal vía TCR $\gamma\delta$ elevada, ya que se puede revertir el defecto en su desarrollo proporcionando de manera exógena una señalización fuerte a través del receptor (agregando los complejos TCR de superficie con anticuerpo) en el timo. Así, la intensidad de la señal del TCR dentro de una ventana de desarrollo tímico específica, es el principal determinante de la generación de células T $\gamma\delta$ pro-inflamatorias y su impacto fisiopatológico. Para entender el mecanismo molecular que subyace en estos procesos, se analizaron los datos obtenidos por *microarrays* comparando la transición de células T $\gamma\delta$ embrionarias a adultas de ratones control vs CD3DH. Entre los ARNm que aumentaban la expresión entre el estadio embrionario y adulto en ratones control y que se ven alterados durante la ontogenia de ratones CD3DH, se encuentran aquellos que se relacionan directamente con la producción de IFN- γ (*Nr4a3*, *Nr4a2* y *Bcl2a1*, genes dependientes de CD27/LT β R) y algunos factores de transcripción como *Egr2*, *Egr3* e *Id3*, descritos como supresores de la ruta de diferenciación IL-17 y dependientes de una intensidad fuerte de la señal a través del TCR. Por último se comprobó cómo la cadena CD3 δ está implicada a nivel intracelular en la conformación y estabilidad de los complejos TCR $\gamma\delta$ en el contexto de haploinsuficiencia de *Cd3g*, a pesar de que la ausencia de la cadena CD3 δ en el TCR $\gamma\delta$ de ratón está generalmente aceptada.

CONCLUSIONES

Estos datos en conjunto permiten reinterpretar los modelos previos sobre el desarrollo de las células T $\gamma\delta$ en el timo. Durante la ontogenia, las distintas ondas de desarrollo (muy relacionadas con el uso de V γ) demandan diferente intensidad de la señal a través del TCR $\gamma\delta$, esclareciendo así el conflicto expuesto sobre las células productoras de IL-17, pues las células V γ 6⁺ (que se originan únicamente durante el desarrollo embrionario temprano) tienen una alta dependencia de señal fuerte a través del TCR, mientras que las células V γ 4⁺ (que aparecen de manera perinatal) no. Por otro lado, el defecto en las células T $\gamma\delta$ productoras de IFN- γ se mantiene durante la ontogenia y estado adulto, en particular en la sub-población T $\gamma\delta$ CD27⁺ CD122⁺ NK1.1⁺.

De esta manera, podemos concluir que las células $T\gamma\delta$ con una mayor capacidad de producir $IFN-\gamma$ dependen de una alta intensidad de la señal a través del TCR, y debido a su ausencia los ratones CD3DH son menos susceptibles a malaria cerebral experimental, poniendo de relieve la importancia fisiopatológica de las células $T\gamma\delta$ $IFN-\gamma^+$. Los resultados permiten inferir también que la reducción de la disponibilidad intracelular de las cadenas CD3 γ y CD3 δ puede alterar la manera en la que estas proteínas se exponen a los procesos de ensamblaje y/o transporte del complejo TCR a la superficie celular, ofreciendo un mecanismo plausible para entender el fenotipo de los ratones CD3DH.

BIBLIOGRAFÍA

- **Muñoz-Ruiz M**, Ribot JC, Grosso AR, Goncalves-Sousa N, Pamplona A, Pennington DJ, et al. TCR signal strength controls thymic differentiation of discrete proinflammatory gammadelta T cell subsets. *Nat Immunol.* 2016; 17:721
- Garcillán B/Marin AV, Jiménez-Reinoso A, Briones AC, **Muñoz-Ruiz M**, García-León MJ, Gil J, Allende LM, Martínez-Naves E, Toribio ML and Regueiro JR; $\gamma\delta$ T lymphocytes in the diagnosis of human T cell receptor immunodeficiencies; *Front. Immunol.* 2015; 6:20
- **Muñoz-Ruiz M**, Perez-Flores V, Garcillan B, Guardo AC, Mazariegos MS, Takada H, et al. Human CD3gamma, but not CD3delta, haploinsufficiency differentially impairs gammadelta versus alphabeta surface TCR expression. *BMC Immunol.* 2013;14:3.
- Reine J, Busto EM, **Muñoz-Ruiz M**, Rossi NE, Rodriguez-Fernandez JL, Martinez-Naves E, et al. CD3gamma-independent pathways in TCR-mediated signaling in mature T and iNKT lymphocytes. *Cell Immunol.* 2011;271(1):62-6.

SUMMARY



INTRODUCTION

The $\gamma\delta$ T cells have recently emerged as a basic cell type within the innate and adaptive immune system, due to their ability to produce cytokines at different time points and to act against various infectious agents such as viruses, bacteria, parasites or even against tumour cells. The different subpopulations of $\gamma\delta$ T lymphocytes that are able to produce mainly IFN- γ or IL-17 are generated in the mouse thymus, but the maturation states or the signals that manage and control this differentiation process are still unknown.

In this context, the TCR appears as a key element to understand the $\gamma\delta$ T lymphocytes development. Thanks to various studies, it is generally accepted/Several studies have shown that cells receiving strong signals through the TCR will have the capacity to produce IFN- γ , while cells that produce IL-17 emerge by default during T cell development just by receiving weak TCR signals. However, this model has been discussed in the last two years because it has been described that $\gamma\delta$ T cells from the SKG mouse (mouse with a hypomorphic mutation in ZAP-70 that reduces the TCR signalling capacity by around 90%) maintain the capacity to produce IFN- γ . However, the production of IL-17 is affected (in both thymus and periphery). Also, other works related the TCR conformational change following activation with the development of IL-17-producing cells. At this point, we planned to address this issue from a different point of view: by decreasing the amount of TCR $\gamma\delta$ in the cell surface in order to interfere the signalling *in vivo*. For/to achieve this aim, mice carrying mutations that affect the expression of CD3 γ , CD3 δ and CD3 ϵ were generated and analysed, but we found no significant differences when compared to control mice. However, when a mouse with simultaneous haploinsufficiency for *Cd3g* and *Cd3d* (CD3DH, for CD3 Double Haploinsufficiency) was analysed, we found that the surface expression of TCR $\gamma\delta$ was reduced, but not that of TCR $\alpha\beta$. Therefore, we considered that this mouse (the lower expression of surface TCR $\gamma\delta$ also implies less signalling capacity) can be a useful tool to understand the role of TCR signal strength in the thymic differentiation of discrete pro-inflammatory $\gamma\delta$ T cell subsets. Note that this mouse model could address this question on the total $\gamma\delta$ T cells repertoire (polyclonal), not only from a monoclonal approach using transgenic mice expressing a single TCR (like it has been described in most of the related work).

AIMS

The general aim of this work is to interfere the *in vivo* TCR $\gamma\delta$ signalling in order to understand the role of TCR in the development of effector $\gamma\delta$ T lymphocytes. To do this, the characterization of the defect found in mice with combined haploinsufficiency of *Cd3g* and *Cd3d* (CD3DH) was performed. To do this, we characterized mice with combined haploinsufficiency for CD3g and CD3d (CD3DH).

In order to study the effect of signal strength on different effector $\gamma\delta$ T cell subpopulations, TCR $\gamma\delta$ signalling ability in CD3DH thymocytes was analysed. Subsequently, possible defects generated by the reduction of TCR signal strength in different subpopulations of effector $\gamma\delta$ T cells (IFN- γ vs IL-17) will be discussed. Altogether, the genes involved in the development process of $\gamma\delta$ T cells were studied. Once the phenotypic aspects of the CD3DH mouse were characterized, a relevant disease model that allows us to highlight the absence of $\gamma\delta$ T cells in our mice was used. We also analysed whether increasing the signalling via TCR $\gamma\delta$ through the administration of an anti-CD3 antibody allowed for the generation of $\gamma\delta$ T cells in CD3DH mice, in order to understand the origin of the defect in these mice.

RESULTS AND DISCUSSION

In order to study the role of the TCR and its transmitted signal in the development of $\gamma\delta$ T cells, a mouse with lower expression of surface TCR $\gamma\delta$ was generated. This animal model has a selective reduction in $\gamma\delta$ T cells: TCR membrane expression, the signal strength through this receptor and the total number of cells. The CD3DH mouse presents normal $\alpha\beta$ T thymocytes (including those dependent on strong agonist selection during development in the thymus), but an alteration in the fetal differentiation of IL-17 producing $\gamma\delta$ T cells that are mostly V γ 6⁺ (this defect is not found in the adult thymus, where producing IL-17 $\gamma\delta$ T cells are mostly V γ 4⁺). These mice also present a severe reduction of IFN- γ -producing CD27⁺ CD122⁺ NK1.1⁺ $\gamma\delta$ T cells during ontogeny and adult status. This selective depletion in adult CD3DH mice also implies a reduction in the IFN- γ ⁺ $\gamma\delta$ T cells peripheral compartment, resulting in increased resistance to experimental cerebral malaria, which is dependent on IFN- γ from $\gamma\delta$ T lymphocytes. This population needs elevated TCR $\gamma\delta$ signal strength, since we can reverse the defect in its development by exogenously providing a strong signalling through the receptor (aggregation of TCR complex by adding antibody) in the thymus. Thus, the TCR signal intensity within a specific window of thymic development is the main determinant of the generation of pro-inflammatory $\gamma\delta$ T cells and its pathophysiological impact. To understand the molecular mechanism underlying these processes, microarray data obtained by comparing the transition from embryonic to adult $\gamma\delta$ T cells in CD3DH vs control mice were analysed. Among those mRNAs with increased expression in embryonic and adult stages in control mice that are altered during ontogeny in CD3DH mice, we found some that are directly related to the production of IFN- γ (*Nr4a3*, *Nr4a2* and *Bcl2a1*, genes dependent on CD27/LT β R) and some transcription factors such as *Egr2*, *Egr3* and *Id3*, which have been described as suppressors of the IL-17-dependent differentiation pathway and dependent on strong signals through the TCR. Finally, we found that the CD3 δ chain is intracellularly involved in the formation and stability of the TCR γ complex in the context of CD3 γ haploinsufficiency, despite the idea of the absence of the CD3 δ TCR $\gamma\delta$ chain in the mouse.

CONCLUSIONS

Altogether, these data allowed us to reinterpret previous ideas on the development of $\gamma\delta$ T cells in the thymus. First, we found that during ontogeny, the different waves of thymic development (closely related to the use of V γ) require different signal strength through the TCR $\gamma\delta$, thus clarifying the conflict on IL-17 producing cells, since V γ 6⁺ cells (originated only during embryonic development) have a high dependence on strong signal through the TCR, while V γ 4⁺ cells (shown perinatally) do not. Furthermore, the IFN- γ defect continues throughout the life of $\gamma\delta$ T cells due to the absence of CD27⁺ CD122⁺ NK1.1⁺ $\gamma\delta$ T cells. Hence, we can conclude that the $\gamma\delta$ T cells with greater ability to produce IFN- γ depend on a high intensity of TCR signal and because of their absence, CD3DH mice are less susceptible to experimental cerebral malaria than control mice, thus highlighting the pathophysiological significance of IFN- γ ⁺ $\gamma\delta$ T cells. These results also allow us to infer that reducing the intracellular availability of CD3 γ and CD3 δ chains can alter the way in which these proteins are exposed to different processes during assembly and/or transport of the TCR complex to the cell surface, providing a reasonable mechanism to understand the phenotype of CD3DH mice.

BIBLIOGRAPHY

- **Munoz-Ruiz M**, Ribot JC, Grosso AR, Goncalves-Sousa N, Pamplona A, Pennington DJ, et al. TCR signal strength controls thymic differentiation of discrete proinflammatory gammadelta T cell subsets. *Nat Immunol.* 2016; 17:721.
- Garcillán B/Marin AV, Jiménez-Reinoso A, Briones AC, **Muñoz-Ruiz M**, García-León MJ, Gil J, Allende LM, Martínez-Naves E, Toribio ML and Regueiro JR; $\gamma\delta$ T lymphocytes in the diagnosis of human T cell receptor immunodeficiencies; *Front. Immunol.* 2015; 6:20
- **Munoz-Ruiz M**, Perez-Flores V, Garcillan B, Guardo AC, Mazariegos MS, Takada H, et al. Human CD3gamma, but not CD3delta, haploinsufficiency differentially impairs gammadelta versus alphabeta surface TCR expression. *BMC Immunol.* 2013;14:3.
- Reine J, Busto EM, **Munoz-Ruiz M**, Rossi NE, Rodriguez-Fernandez JL, Martinez-Naves E, et al. CD3gamma-independent pathways in TCR-mediated signaling in mature T and iNKT lymphocytes. *Cell Immunol.* 2011;271(1):62-6.

ABREVIATURAS



ABREVIATURA	SIGNIFICADO
ADNc	Ácido ribonucleico complementario
Akt	<i>Protein kinase B</i> (Proteína kinasa B)
APC	<i>Allophycocyanin</i> (aloficocianina)
APC-Cy7	<i>Allophycocyanin-cyanine 7</i> (aloficocianina - cianina 7)
ARNm	Ácido desoxirribonucleico mensajero
BSA	Albúmina de suero bovino
Ca ²⁺	Calcio
CD	Cluster de diferenciación
CIA	Artritis inducida por colágeno
cKit	Receptor del factor de crecimiento de mastocitos y células madre
DETC	<i>Dendritic Epidermal T Cells</i> (Células T dendríticas epiteliales)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DN	Doble Negativo (timocito CD4 ⁻ CD8 ⁻)
DP	Doble Positivo (timocito CD4 ⁺ CD8 ⁺)
E16	Estado embrionario tardío a día 16
E16	Estado embrionario tardío a día 15
E17	Estado embrionario tardío a día 17
E18	Estado embrionario tardío a día 18
EAE	<i>Experimental Autoimmune Encephalomyelitis</i> (encefalomielitis autoinmune experimental)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
Erk	<i>Extracellular signal-Regulated kinase</i> (quinasa del receptor extracelular activado)
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> (suero bovino fetal)
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i> (isotiocianato de fluoresceína)
Fluo-4/AM	Aceto-metil éster de fluo-4
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> (Proteína verde fluorescente)
GITR	<i>Glucocorticoid-induced tumour necrosis factor receptor</i> (receptor del factor de necrosis tumoral inducida por glucocorticoides)
h	Horas
IFN-γ	Interferón-γ
IL	Interleucina
ILC	<i>Innate lymphoid cell</i> (células linfoides innatas)
ITAM	<i>Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif</i> (motivo de activación del inmunorreceptor basado en tirosinas)
Itk	<i>Inducible T cell kinase</i> (quinasa inducible de células T)
KDa	Kilodalton
KO	<i>Knock out</i> (desactivación génica)
Lin ⁻	<i>Lineage-negative</i> (células negativas para marcadores de linaje de células maduras)
mAb	<i>Monoclonal antibody</i> (anticuerpo monoclonal)
MFI	<i>Mean Fluorescence Intensity</i> (intensidad media de fluorescencia)
mg	Miligramos
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (complejo principal de histocompatibilidad)
min	Minutos
ml	Mililitros
Nck	<i>Non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1</i> (proteína de interacción al TCR)
NFAT	<i>Nuclear Factor of Activated T cell</i> (factor nuclear de linfocitos T activados)
NF-κB	<i>Nuclear Factor-κB</i> (factor nuclear κB)
NKT	<i>Natural Killer T cell</i> (células T asesinas naturales)
nm	Nanómetros
PAGE-SDS	<i>SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> (electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida)
PB	<i>Pacific Blue</i> (azul pacífico)

Abreviaturas

PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (tampón fosfato salino)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	<i>Phycoerythrin</i> (ficoeritrina)
Pe-Cy7	<i>Phycoerythrin-Cyanine 7</i> (ficoeritrina - cianina 7)
PerCPCy5.5	<i>Peridinine Chlorophyll Protein Complex-cyanine 5.5</i> (proteína de peridinina clorofila complejo de cianina 5.5)
PMA	Acetato de forbol miristato
PRS	Secuencia rica de prolina
PVDF	<i>Polyvinylidene Difluoride</i> (fluoruro de polivinilideno)
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RAG	<i>Recombination Activating Gene</i> (gen activador de la recombinación)
RBCL	<i>Red Blood Cell Lysis</i>
RE	Retículo endoplásmico
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i> (medio Roswell Park Memorial Institute)
s	Segundos
Sca	<i>Stem cells antigen-1</i>
SCID	<i>Severe combined immunodeficiency</i> (inmunodeficiencia combinada grave)
SD	<i>Standar Deviation</i> (desviación estándar)
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Dodecil sulfato sódico)
SP	Simple positivo (timocito CD4 ⁺ CD8 ⁻ o CD4 ⁻ CD8 ⁺)
Tc	Linfocito T citotóxico
TCR	<i>T Cell Receptor</i> (Receptor de la célula T)
TECs	Thymic epithelial cells (Células tímicas epiteliales)
Th	Linfocito T <i>helper</i> (cooperador)
Treg	Linfocito T regulador
vs	<i>versus</i>
WB	<i>Western Blot</i>
WT	<i>Wild type</i> (tipo salvaje o cepa control)
ZAP-70	<i>Zeta-chain Associated Protein kinase 70</i> (Proteína asociada a Z de 70kDa)
β2m	β2 microglobulina

INTRODUCCIÓN



1. LINFOCITOS T Y SUS RECEPTORES DE ANTÍGENO

Los linfocitos T son un tipo de leucocitos responsables de coordinar la respuesta inmunitaria celular. También se ocupan de la cooperación para desarrollar distintas formas de respuestas inmune, como la producción de anticuerpos por los linfocitos B¹. La denominación de estos linfocitos como “T” se debe a que su maduración tiene lugar en el timo (órgano linfoide que constituye uno de los controles centrales del sistema inmunitario del organismo).

El linfocito T se caracteriza por la presencia de un complejo multiprotéico en la membrana plasmática denominado receptor de antígeno de la célula T (complejo TCR/CD3 o TCR en adelante)²(Fig. 11). La respuesta inmune adquirida se sustenta, principalmente, en la capacidad de estos linfocitos para reconocer y discriminar entre una amplia gama de antígenos extraños³. Así, reconoce fragmentos de antígenos presentados por las células presentadoras de antígenos o dianas en el contexto de las moléculas de MHC propias⁴ y traduce esta afinidad en distintas respuestas celulares⁵.

Se pueden diferenciar dos tipos de complejos TCR que se definen por su heterodímero TCR ($\alpha\beta$ o $\gamma\delta$)^{6, 7}. De este modo, la población de células T está compuesta por dos subpoblaciones, la mayoritaria (90-95%) formada por linfocitos $T\alpha\beta$ ⁸ y la minoritaria por $T\gamma\delta$ (1-10%)⁹. El reconocimiento antigénico de ambas subpoblaciones también presenta sustanciales diferencias; dentro de los linfocitos $T\alpha\beta$ cuando la molécula MHC de clase II presenta el antígeno, es el linfocito Th quién lo reconoce, mientras que el linfocito Tc hace lo propio en el contexto de las MHC de clase I¹⁰, aunque también se ha descrito una vía no clásica para el procesamiento y presentación de lípidos y glicolípidos de diferentes orígenes denominada vía de CD1¹¹. Los linfocitos $T\gamma\delta$, sin embargo, pueden reconocer antígenos restringidos por MHC clásicas, no clásicas e incluso pueden unirse directamente a antígeno¹². También se sabe que estos linfocitos pueden ser activados para la producción de citoquinas sin necesidad de contacto antígeno-TCR (vía citoquinas)^{13, 14}. Consecuentemente, la función de estos dos linajes es muy dispar: las células $T\alpha\beta$ reconocen péptidos procesados y presentados por moléculas de histocompatibilidad, mientras que los linfocitos $T\gamma\delta$ pueden reconocer una amplia gama de antígenos incluyendo proteínas propias inducidas por estrés o infección en ratón e incluso lípidos. Por esta razón, los linfocitos $T\gamma\delta$ constituyen para muchos un linaje innato de defensa¹⁵.

De cualquier manera, una vez que el TCR une antígeno, los heterodímeros $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ deben comunicar el reconocimiento de ligando a las subunidades de señalización CD3 mediante un mecanismo que no se conoce con exactitud en el que juegan un papel clave los dominios ITAM^{6, 16}. Se han propuesto varios modelos para este mecanismo en los que cambios conformacionales, agregación del TCR, o ambos, serían responsables de iniciar esta señal^{6, 8, 17}.

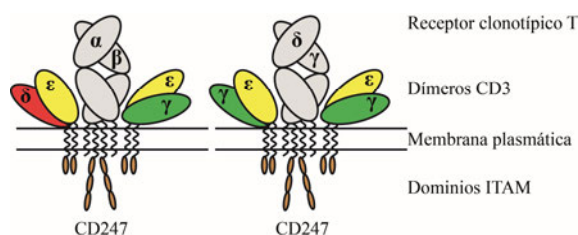


Figura 11. Receptores de antígeno del linfocito T (TCR) en el ratón. El antígeno interacciona con las cadenas TCR, permitiendo que las cadenas CD3 transmitan la señal activadora al interior celular. Dentro del dominio citoplasmático de todas las cadenas CD3 se encuentran las regiones denominadas ITAM.

2. LINFOCITOS $T\gamma\delta$

Las células $T\gamma\delta$, descritas hace tres décadas¹⁸, siguen generando controversia en el estudio de las células linfoides^{9, 19}. Junto con los linfocitos $T\alpha\beta$ y los linfocitos B son las únicas células pertenecientes al sistema inmunológico que son capaces de utilizar la recombinación somática V, (D), J para generar una elevada diversidad en su receptor antigénico de superficie. Además, su contribución diferencial está bien ilustrada por su variable representación en diferentes especies y enfermedades^{20, 21}. Los linfocitos $T\gamma\delta$ son minoritarios comparados con los linfocitos $T\alpha\beta$, como se ha dicho con anterioridad, pero a diferencia de estos últimos que se localizan en órganos linfoides secundarios, se encuentran localizados principalmente en superficies epiteliales (aunque también se pueden encontrar en la mayoría de órganos linfoides). Además de no estar restringidos exclusivamente por MHC para reconocer antígeno, la variedad de los que reconoce es mucho más amplia que la de un $TCR\alpha\beta$ (MHC no clásicas, lípidos, proteínas producidas por estrés etc.)²². Se sabe que estas células $T\gamma\delta$ adquieren su capacidad efectora durante su desarrollo embrionario en el timo, a diferencia de las células $T\alpha\beta$, que lo hacen en periferia tras entrar en contacto con antígeno en los órganos linfoides periféricos²³. Este hecho explica la capacidad de las células $T\gamma\delta$ para la producción rápida de citoquinas (Fig. 12). Además, la cinética de transcripción de estas citoquinas es más rápida en comparación con las células $T\alpha\beta$ $CD4^+$ o $CD8^+$ ²⁴. Por lo tanto, aunque tradicionalmente se han clasificado dentro del sistema inmune adaptativo, estas células en ciertas condiciones pueden comportarse como células del sistema inmune innato¹⁴. Por ello, los linfocitos $T\gamma\delta$ han emergido en los últimos tiempos como un tipo celular de gran importancia dentro del estudio de la respuesta frente a antígenos extraños, siendo una fuente principal de producción de citoquinas pro-inflamatorias como IFN- γ ²⁵ e IL-17²⁶ y de regulación de la expansión y reclutamiento de neutrófilos y monocitos para iniciar la respuesta inflamatoria²⁷.

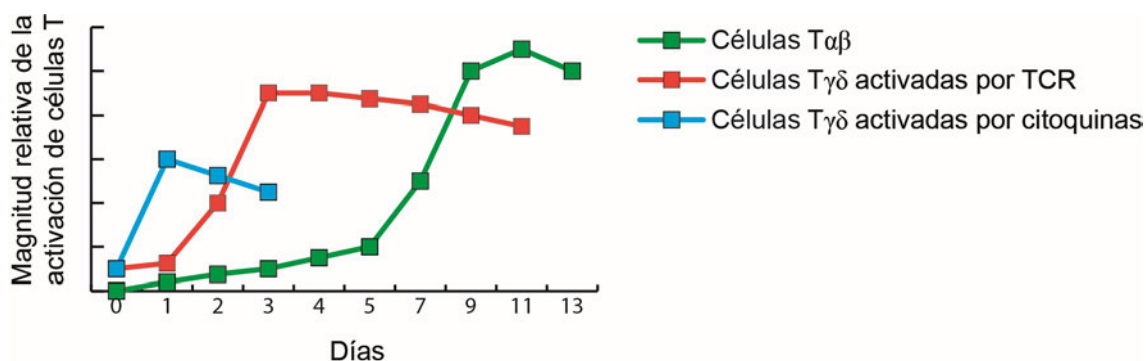


Figura 12. Cinética del desarrollo de la respuesta T. Tras su estimulación, las células $T\gamma\delta$ son capaces de producir IL-17 dentro de las primeras 60h. Las células $T\alpha\beta$ que encuentran un antígeno específico necesitan al menos 5-7 días para desarrollar su función efectora. Adaptado de Chien *et al.*, 2014⁹.

En este contexto, las células $T\gamma\delta$ productoras de IFN- γ participan en la respuesta protectora a infecciones víricas²⁸, bacterianas²⁹ y de parásitos³⁰, así como a tumores²⁵, estando también asociadas a la patogénesis de malaria grave³¹. Por otro lado, las células $T\gamma\delta$ productoras de IL-17 son fundamentales en la defensa contra *Mycobacterium tuberculosis* y *Listeria Monocytogenes*, entre otras infecciones^{27, 32, 33}, pero también son un componente crítico en enfermedades autoinmunes como psoriasis^{34, 35, 36} y EAE^{37, 38, 39}, y cáncer⁴⁰.

2.1. COMPROMISO DE LINAJE $T\gamma\delta$ vs $T\alpha\beta$

A pesar de las claras diferencias expuestas entre los linajes $T\alpha\beta$ y $T\gamma\delta$, se ha descrito que ambos tipos celulares provienen de un progenitor común. Se cree que su origen se encuentra en los precursores hematopoyéticos LSK ($Lin^- Sca^+ cKit^+$) que se originan en la médula ósea y en hígado fetal, de allí pasan al torrente sanguíneo entrando en el timo por la unión cortico-medular dando lugar a los timocitos más inmaduros que serían $CD4^- CD8^-$ (DN)⁴¹. Este progenitor común, puede subdividirse a su vez en 4 estados de maduración diferentes, dependiendo de los marcadores de expresión CD44 y CD25. DN1 ($CD44^+ CD25^-$), DN2 ($CD44^+ CD25^+$), DN3, ($CD44^- CD25^+$), DN4 ($CD44^- CD25^-$) (Fig. I3), siendo en el estado DN2 donde comienza el reordenamiento de los *loci* *Tcrb*, *Tcrd* y *Tcrq* y el final de DN3 donde pueden observarse las divergencias de linaje $T\alpha\beta$ y $T\gamma\delta$ ⁴¹ (Fig. I3). El estado en el que el linaje $T\gamma\delta$ se diferencia no se conoce con exactitud, aunque parece que a partir de células DN3 solo se desarrollan células $T\gamma\delta$ $IFN-\gamma^+$, lo que indicaría que la generación de células $T\gamma\delta$ IL-17⁺ tiene lugar en la etapa DN2⁴². En este proceso de diferenciación de linaje se ha demostrado con claridad que el TCR juega un papel fundamental, dirigiendo la célula hacia un destino $T\alpha\beta$ o $T\gamma\delta$. Hasta 2005, dos modelos se habían postulado para entender la decisión de linaje $T\alpha\beta$ o $T\gamma\delta$ (instruccionista vs estocástico). El modelo instruccionista postula que esta decisión depende del isotipo de TCR que se reordene correctamente, si existe un reordenamiento productivo del pre-TCR ($pT\alpha\beta$) la célula se dirigirá hacia el linaje $T\alpha\beta$ y si se reordena el $TCR\gamma\delta$ hacia el linaje $T\gamma\delta$ ⁴³. Sin embargo, el modelo selectivo o estocástico afirma que la decisión se toma en estadios anteriores, previos a la expresión del TCR⁴⁴. Con todo, algunos estudios, demostraron que se pueden obtener ambos linajes, $T\alpha\beta$ y $T\gamma\delta$ modulando la capacidad del $TCR\gamma\delta$ para generar señales débiles o fuertes respectivamente, usando un transgen $TCR\gamma\delta$ ^{45, 46}. Gracias a estos experimentos y al modelo de “la intensidad de la señal” a través del TCR descrito por ellos se sabe que la señal del TCR es un determinante crítico para la decisión del linaje final. Sin embargo, poco se sabe acerca del papel que juega el TCR y la intensidad de la señal en la diferenciación efectora posterior de las células $T\gamma\delta$ en particular.

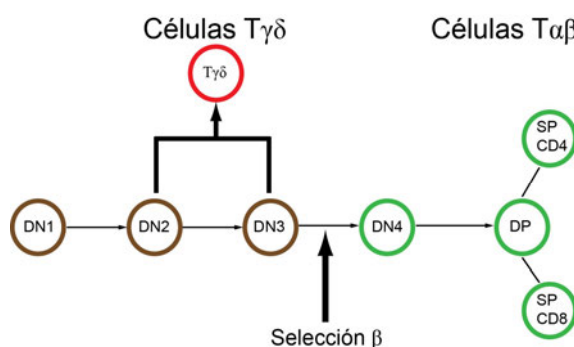


Figura I3. Diferenciación de los linfocitos $T\gamma\delta$ en el timo. Los timocitos más inmaduros que se observan son $CD4^- CD8^-$ (DN) que se pueden diferenciar secuencialmente en cuatro grupos dependiendo de la expresión de los marcadores CD44 y CD25. El estado DN en el que el linaje $T\gamma\delta$ se diferencia no se conoce con exactitud. El linaje $T\alpha\beta$ continúa hacia el estadio DP constituyendo aproximadamente un 80% del total de células de un timo normal, posteriormente aparecen las células SP4 y SP8 que se localizan en la médula. También se sabe que en la corteza tímica las células DP condicionan a las DN y a las $T\gamma\delta$ en *trans*. Adaptado de Pennington *et al.*, 2005⁴¹ y Blanco *et al.*, 2014⁴⁷.

2.2. DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS $T\gamma\delta$ EFECTORAS EN EL TIMO ($IFN-\gamma$ vs IL-17)

A diferencia de las células $T\alpha\beta$, los linfocitos $T\gamma\delta$ adquieren su capacidad efectora en el timo^{9, 23} por lo que exhiben una plasticidad limitada en periferia (aunque no es nula⁴⁸). En 2009 se describió que las células que expresan durante su desarrollo tímico CD27 en su membrana (miembro de la familia del receptor del factor de necrosis tumoral), generalmente son aquellas

capaces de producir IFN- γ , sin embargo, las células que producen IL-17 se ciñen al grupo de CD27⁴⁹, posteriormente se describieron otros marcadores asociados directamente con la producción de estas citoquinas, como NK1.1 y CD122³⁷ con IFN- γ y CCR6⁵⁰ con IL-17. Por lo tanto, los perfiles de citoquinas de las células T $\gamma\delta$ periféricas están predeterminados principalmente por un mecanismo que implica la señalización vía CD27 en el timo, además de otras señales para su proliferación y supervivencia, como por ejemplo vía CD28^{51, 52}.

Sin embargo, los mecanismos que controlan los estados de maduración y que dan lugar a distintos tipos de células efectoras no se conocen con claridad. El papel central del TCR en este proceso de diferenciación funcional parece cada vez más relevante^{37, 53}, sugiriendo un modelo de dependencia del TCR para el destino efector de las células T $\gamma\delta$. Aunque algunos estudios recientes ponen en entredicho estas afirmaciones⁵⁴: el modelo de independencia del TCR o modelo de predeterminación postula que el último destino efector de las células T $\gamma\delta$ no está influenciado por ninguna señal a través del TCR. Algunas observaciones que apoyan este modelo se han descrito principalmente para las células T $\gamma\delta$ con capacidad para producir IL-17. De hecho, sobre el total de células T $\gamma\delta$ conocidas solo se han descrito un 1% de células T $\gamma\delta$ con ligandos específicos^{37, 55}, así parece poco probable que la unión de ligando al receptor sea el único mecanismo que genere una intensidad fuerte de señal a través del mismo. Esta suposición, también se apoya en la capacidad del TCR $\gamma\delta$ para generar señales de manera independiente al ligando en timocitos DN^{37, 56}, como se ha descrito extensamente para el pre-TCR (pT $\alpha\beta$)⁵⁷ y donde se ha definido como una “señal tónica”⁵⁸.

2.2.1. Diferenciación dependiente de TCR

Así, diversos trabajos han postulado que la intensidad de la señal transmitida por el receptor de membrana, está relacionada directamente con la generación de células T $\gamma\delta$ efectoras (IFN- γ vs IL-17) sin tener en cuenta una visión adaptativa vs innata de los linfocitos T $\gamma\delta$.

El primero de estos trabajos utilizó para estudiar el papel de la interacción ligando-receptor en la decisión del destino efector T $\gamma\delta$ uno de los ligandos mejor conocido del TCR $\gamma\delta$ (la molécula MHC no clásica de clase I, T10-T22 que es reconocida por los TCR transgénicos G8 y KN6). Para ello usaron un ratón β 2mKO que expresaba G8 y KN6 (la molécula T10-T20, requiere β 2m para su expresión en superficie) y comprobaron que estos ratones presentaban idéntico número de células T $\gamma\delta$ reactivas a T10-T22 que los ratones control G8 y KN6 (las células T $\gamma\delta$ de estos ratones son exclusivamente V γ 4⁵⁹). Así, este hecho permitió el estudio de uno tipo específico linfocitos T $\gamma\delta$ que se desarrollan en presencia (ratones control) o en ausencia de su ligando (ratones β 2mKO). Se comprobó que, a pesar de no encontrarse diferencias en cuanto al número de células reactivas a T10-T22, los linfocitos T $\gamma\delta$ que se desarrollaban en presencia de ligando eran capaces de producir IFN- γ tras estímulo del TCR y expresar marcadores de superficie asociados con su producción (como CD122 y NK1.1), mientras que las células que se desarrollaban en ausencia de ligando producen IL-17 y no expresan estos marcadores asociados con la producción de IFN- γ ³⁷.

Un análisis con conclusiones similares, se realizó sobre células DETC (V γ 5⁺), que son dependientes de la expresión de *Skint-1* en TECs para su desarrollo^{60, 61} y son capaces producir IFN- γ ⁵⁰. De hecho, los ratones portadores de una mutación en esta molécula presentan un compartimento DETC muy difuso en la piel, ya que las células que se desarrollan en ausencia de *Skint-1* adoptan particularidades similares al linaje efector IL-17 y cambian sus características de “localización” hacia el peritoneo y útero principalmente. Así, se vuelve a relacionar directamente la intensidad de la señal con la especificidad de linaje efector durante el desarrollo de las células T $\gamma\delta$, pues se postula que una intensidad elevada de señal, tanto en el timo embrionario a día 16

(*Skint-1*) como en el timo adulto (usando anticuerpo anti-TCR $\gamma\delta$) activará el factor de transcripción *Egr3* y este induce la diferenciación de los linfocitos T $\gamma\delta$ hacia un destino efector con capacidad de producir IFN- γ . Al mismo tiempo se regula negativamente la expresión de *Ror γ t* y *Sox13* que son necesarios para la generación de células IL-17 efectoras⁶². Por el contrario en ausencia de una interacción receptor-ligando fuerte (deficiencia de *Skint-1* o ausencia de anticuerpo), la expresión de *Ror γ t* se mantiene en el tiempo junto con la de *Sox13* e inducen la adopción del destino efector IL-17⁶¹. Demostrando así como en el caso anterior que la diferenciación de una célula T $\gamma\delta$ puede ser alterada a través de cambios en la intensidad de la señal recibida por el receptor. Por lo tanto este resultado sugiere que una señal débil a través del TCR (provocada por ausencia de ligando) dará lugar a la generación de células con capacidad para producir IL-17, mientras que una señal más intensa a través del TCR (generada por una interacción receptor-ligando fuerte) dará lugar a la adopción del destino efector IFN- γ ⁶¹ (Fig. I4).

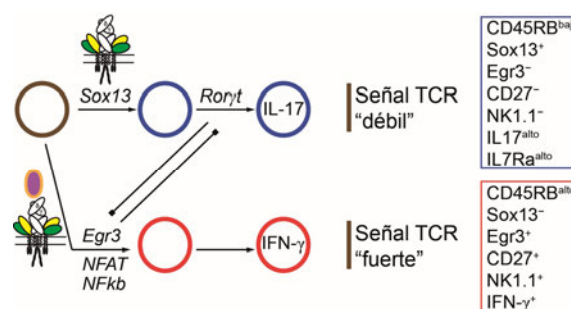


Figura I4. Modelo de diferenciación de las células T $\gamma\delta$ efectoras dependiente del TCR. Las células T $\gamma\delta$ CD27⁺ reciben una señal fuerte a través del TCR durante su desarrollo en el timo, y serán las células con capacidad para producir IFN- γ . Por su parte, las células T $\gamma\delta$ CD27⁻ aparecen por defecto durante el desarrollo tímico, recibiendo únicamente una señal débil a través de su TCR y producirán IL-17. Adaptado de Hayday *et al.*, 2011⁶¹.

A pesar de estos datos, este modelo no explica, por ejemplo, que las células V γ 6⁺ (con capacidad producir IL-17) muestren evidencias de selección TCR CDR3 restringida⁶³ o por qué la mayoría de las células T $\gamma\delta$ de periferia son mayoritariamente productoras de IFN- γ , a pesar de que los ligandos para células T $\gamma\delta$ sólo se han descrito para el 1% de estas células⁶⁴. También permanece sin responder, qué grado de la señal depende de la participación del ligando del TCR o de las propiedades intrínsecas del propio receptor (estequiometría, tipo de señal transducida a través del mismo, etc.)

En la última década, se ha descrito otro subtipo de células efectoras que dependen del TCR para su desarrollo, aunque presentan características propias de células innatas (células T $\gamma\delta$ *innate-like*)²³. Dentro de este grupo, por un lado tenemos los linfocitos T $\gamma\delta$ que expresan/dependen PLZF y por otro aquellos que tiene una rápida capacidad de respuesta a diferentes citoquinas. El primero de estos grupos está restringido por: la expresión de V γ 1.1⁺, marcadores NK (cómo NK1.1), expresión de IFN- γ +IL-4 y la dependencia variable del factor de transcripción PLZF. La expresión de este factor de transcripción también se ha relacionado directamente con una afinidad alta de ligando, pues las células del ratón transgénico KN6 en presencia de ligando de baja afinidad T10^d, no es capaz de adoptar un destino innato, mientras que en presencia de un ligando de alta afinidad si (T10/T22)⁶⁵. Del mismo modo que PLZF, el factor de transcripción ThPOK, también es inducible tras señal fuerte del TCR y se relaciona con la generación de células V γ 1.1⁺ (la deficiencia de ThPOK debilita su generación)⁶⁶. Por lo tanto, se puede interpretar que estas células (denominadas también T $\gamma\delta$ *NKT-like*) son dependientes de una señalización fuerte vía TCR para su desarrollo T dada su relación con la alta intensidad de la señal a través del TCR (PLZF, ThPOK, etc.) (Fig. I5). Por otro lado, para identificar el segundo grupo de células innatas

como dependientes de señal fuerte vía TCR durante su desarrollo, se utilizó un modelo de ratón con una mutación hipomórfica en ZAP-70 (molécula de activación tirosina quinasa próxima al TCR) que permite una reducción en la señal TCR de hasta el 90%⁶⁷. Analizando las células $T\gamma\delta$ de este ratón, se observó un defecto en el desarrollo de las células productoras de IL-17 que eran $CD44^+$ y que a su vez eran sensibles a activación con IL-23 e IL-1 β e hiporeactivas a estimulación a través del TCR en timo y periferia (su capacidad de respuesta es detectable únicamente a concentraciones altas de anticuerpo). Consecuentemente, se puso de manifiesto la dependencia del TCR en el desarrollo de un grupo de células $T\gamma\delta$ con características innatas y capacidad para producir IL-17, lo que discute el modelo propuesto con anterioridad (Fig. 14). Posteriormente plantearon si este fenómeno de hiporespuesta en periferia y dependencia del TCR durante el desarrollo era una característica única de este grupo de células productoras de IL-17 o era extensible a otros grupos de células $T\gamma\delta$ *innate-like*. Para ello analizaron en piel una población de células $T\gamma\delta$ que es capaz de expresar receptores innatos de NKG2D en su membrana y que fue descrita con anterioridad (DETC), y se observó el mismo fenómeno que en las células productoras de IL-17 $CD44^+$. Por último fueron capaces de describir una población tímica con capacidad de producir IFN- γ , que era $CD27^+$, capaz de responder a IL-12 e IL-18, y que además expresa un marcador dependiente de señal característico, como es CD45RB (recordando así las características de señalización fuerte de las células $T\gamma\delta$ *NKT-like*) y características de hiporespuesta. Esto les permitió establecer un nuevo papel del TCR durante el desarrollo de las células $T\gamma\delta$ con características innatas, pues a diferencia del papel normal de activación en la periferia del TCR (impronta adaptativa) en este caso jugaría un papel como punto de control durante el desarrollo para permitir a estas células adquirir las características innatas (rápida respuesta a citoquinas). Después de este ejercicio de control, estas células bajarían su nivel de respuesta a estímulos a través del TCR (hiporespuesta) y el papel del TCR sería únicamente de control del ambiente con capacidad para responder en situaciones de estrés elevado (alta concentración de ligando) permitiendo así colaborar con la respuesta innata típica de estas células descritas. De esta manera, diversos trabajos han postulado durante los últimos años^{37, 61} que la intensidad de la señal a través del receptor de membrana, de la más débil a la más fuerte, está relacionada directamente con la generación de células $T\gamma\delta$ IL-17, IFN γ e innatas, respectivamente (Fig. 15).

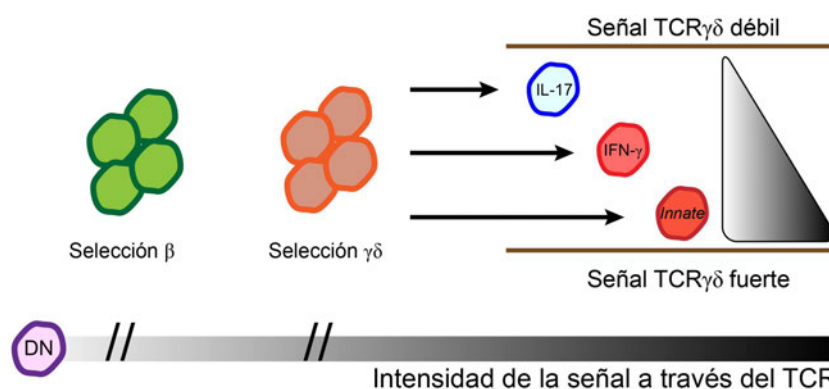


Figura 15. Modelo de la intensidad de la señal TCR para determinar el compromiso de linaje $T\alpha\beta$ vs $T\gamma\delta$ y la diferenciación $T\gamma\delta$ efectora. La bifurcación $T\alpha\beta$ y $T\gamma\delta$ ocurre en el estado DN3 del desarrollo T. Las células DN3 que han reordenado una cadena funcional β , reciben señales pre-TCR débiles y se convierten en células DP $T\alpha\beta$. Después, el reordenamiento de la cadena $TCR\alpha$ y la selección positiva, aumentan de la fuerza de las señales $TCR\alpha\beta$ lo que afectará a la diferenciación de las células $CD8^+$, $CD4^+$, NKT, y las células Treg. Las células DN3 que han reordenado cadenas $TCR\gamma$ y $TCR\delta$ funcionales, reciben señales fuertes vía $TCR\gamma\delta$ y se dirigen hacia la selección $T\gamma\delta$ (células DN). El incremento de la intensidad de las señales $TCR\gamma\delta$, marcará los diferentes destinos de la función efectora. Las señales débiles inducen la producción de IL-17, señales fuertes inducen IFN- γ y las señales más fuertes son inductoras de células $T\gamma\delta$ *innate-like*. Adaptado de Zarim *et al.*, 2014⁶⁸.

Basándonos en esta diferenciación y en la dependencia del TCR para el estímulo de la célula T podemos establecer tres grupos claros de linfocitos $T\gamma\delta$ efectoras: Primero, células que son capaces de producir IL-17 tras estimulación a través de su TCR (IL-17 inducibles), son células $CD27^-$ que tras inmunización y estimulación prolongada a través del TCR (48-60h) son capaces de inducir la expresión de CCR6^{9, 69}, producir IL-17 y salen del timo como $CD44^{low70}$. Segundo, células productoras de IFN- γ ($CD27^+$) que también responden a estímulo a través del TCR y que principalmente son $CD122^{+37}$. Tercero, un grupo emergente que todavía es objeto de estudio conocido como células $T\gamma\delta$ *innate-like*^{14, 23}, que engloba todas las células que son capaces de responder a estímulos innatos y que dependen en menor medida del TCR para su estimulación tras maduración (aunque el papel del TCR durante su desarrollo genera controversia en la actualidad^{37, 71}). Igual que las células de impronta adaptativa, descritas anteriormente, las células con características innatas también se pueden subdividir en productoras de IL-17¹⁴ ($CD27^- CD44^+$) e IFN- γ (DTEC⁶¹, NK1.1^{53, 72}) y presentan en ambos casos una elevada expresión de CD44, lo que podría sugerir que han recibido algún tipo de señal a través de su TCR durante el desarrollo, al tratarse de un marcador de experiencia antigénica.

2.2.2. Diferenciación independiente de TCR

A pesar de que está generalmente aceptado el papel del TCR como un elemento central dentro de la diferenciación efectora de células $T\gamma\delta$, algunos datos recientes sugieren que la diferenciación hacia un tipo efector característico es independiente del TCR y su señalización, lo que indicaría que es un proceso previo a la expresión del $TCR\gamma\delta$.

Esta teoría se apoya especialmente en el estudio del desarrollo de las células $T\gamma\delta$ productoras de IL-17^{54, 73}. En este contexto, se realizó un extensivo perfil de expresión génica en células $T\gamma\delta$ inmaduras ($CD24^+$) clasificándolas según los diferentes elementos $V\gamma$ expresados. Los autores señalan en este punto, que estas células por el hecho de ser inmaduras no han recibido influencia de la señalización vía TCR. Asumiendo esto como cierto, se demuestra que las distintas $V\gamma$ de las células $T\gamma\delta$ se pueden agrupar en función de los factores de transcripción que expresan (por ejemplo las células $V\gamma4^+$ productoras de IL-17 necesitan para su generación una red de factores de transcripción compuesta por *Sox13*, *Sox4*, *Tcf1*, *Lef1*) lo que supone que el perfil génico característico de cada subgrupo efector está presente antes de la entrada en escena del TCR, estos autores también añaden que la gran mayoría de las células $T\gamma\delta$ no interactúan con ligando conocido durante su desarrollo³⁷. Sin embargo, a pesar del fenotipo inmaduro de estas células no se ha demostrado que por ser $CD24^+$ no hayan tenido contacto con antígeno y que no estén influenciadas por la señalización vía TCR. Además de estos datos basados en el perfil génico de las células $T\gamma\delta$, hay otros que apoyan la independencia de la diferenciación efectora de las células $T\gamma\delta$ de la señalización vía TCR. Por ejemplo, se ha descrito que en ausencia de *Hes* (un represor transcripcional regulado por *Notch*) hay una disminución en el desarrollo de células $T\gamma\delta$ productoras de IL-17 en el timo fetal. Lo que demuestra que la vía de señalización de *Notch*, juega un papel fundamental en el desarrollo de estas células⁷⁴. Sin embargo, algunos autores se refieren a esta señalización vía *Notch* como una vía complementaria a la del TCR, donde una señal débil vía $TCR\gamma\delta$ se puede complementar con una señal vía *Notch* para generar células $T\gamma\delta$ con capacidad de producir IL-17, mientras que una señal fuerte a través del $TCR\gamma\delta$ dará como resultado, células con capacidad para producir IFN- γ ^{61, 74, 75}. Recientemente se ha descrito que el ambiente puede ser otro factor diferencial en el desarrollo de estos linfocitos (en este caso nuevamente productores de IL-17) y que sea independiente del TCR. Para ello se ha comprobado que estas células no son capaces de desarrollarse en un timo adulto, por lo que necesitan un timo embrionario y progenitores fetales para su desarrollo⁷⁶. Además se pone de manifiesto que la IL-17 producida por las células $T\alpha\beta$ juega un papel regulador negativo en el desarrollo de estas células, pues si se bloquean las células $T\alpha\beta$ productoras de IL-17, sería posible el desarrollo de

linfocitos $T\gamma\delta$ productores de IL-17. Por lo tanto, se sabe que hay un tipo celular específico que tiene capacidad para producir IL-17, las células que expresan $V\gamma 6$, que únicamente se desarrollan en una ventana temporal específica. Esta onda temporal se circunscribe al timo embrionario (alrededor de E16/17) y la necesidad de ser generadas a través de precursores embrionarios, pues se demostró que los precursores adultos son incapaces de generar estas células⁷⁶. El resto de células con capacidad para producir IL-17, como podrían ser las $V\gamma 4^+$, son generadas después del nacimiento y se mantienen en adultos por auto-renovación⁷⁶.

2.2.3. Ondas de diferenciación tímica vs destino $T\gamma\delta$ efector

Cada vez existen más evidencias de que la diferenciación funcional de las células $T\gamma\delta$ está estrechamente ligada con el uso de los distintos elementos $V\gamma$. Se ha demostrado, por ejemplo, que existe una clara divergencia en la red genética entre las poblaciones productoras de IL-17 ($V\gamma 6^+$ y $V\gamma 4^+$) y las productoras de IFN- γ ($V\gamma 1^+$ y $V\gamma 5^+$)⁵⁴. Además, se sabe que en órganos linfoides periféricos, donde un gran número de las células $T\gamma\delta$ son $V\gamma 1^+$ y $V\gamma 4^+$, la mayoría de $T\gamma\delta$ productoras de IFN- γ serán $V\gamma 1^+$, mientras que las células que producen IL-17 se caracterizan por ser mayoritariamente $V\gamma 4^{+49, 77, 78}$. Por lo tanto, parece obvio pensar que los modelos monoclonales estudiados no sean la mejor herramienta para poder abordar esta pregunta (debido al sesgo que podría conllevar el uso de una única cadena $V\gamma$). En este contexto se conoce el tiempo en el que tiene lugar esta diferenciación funcional en el timo y que está estrechamente regulada por el uso de estos $V\gamma$ ⁷⁹ (Fig. I6), en lo que se conoce como ventanas/ondas de diferenciación tímica de las células $T\gamma\delta$. Así por ejemplo, las células $V\gamma 5^+$ son únicamente generadas alrededor del día E15/16 y son capaces de producir casi exclusivamente IFN- γ , mientras que dos días después el timo embrionario será capaz de producir únicamente una nueva onda de células $T\gamma\delta$ asociada con el uso $V\gamma 6$ con capacidad exclusiva para generar IL-17, como se ha descrito en el capítulo anterior (sin rastro de células $V\gamma 5^+$). Estas ventanas están definidas por la composición molecular del ambiente tímico (TCR, correceptores del TCR y citoquinas) y juegan un papel fundamental en el desarrollo de los linfocitos $T\gamma\delta$ ⁷⁶. Así, se diferencian al menos cinco subgrupos que son producidos y exportados por el timo en diferentes periodos del desarrollo (fetal, neonatal y adulto) y aunque no se superponen directamente con el uso exclusivo de un $V\gamma$ concreto, con el tiempo sí que guardan cierta relación (Fig. I6).

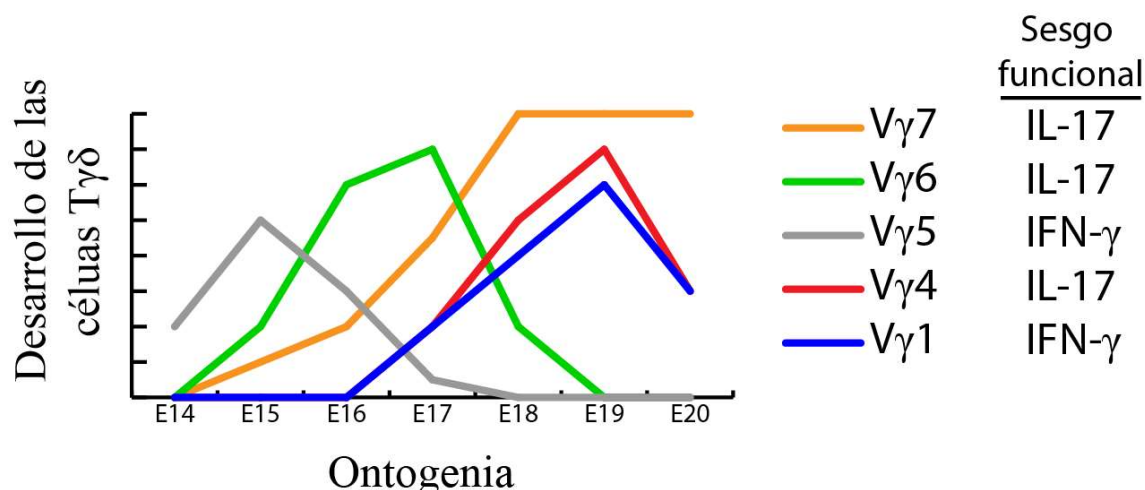


Figura I6. Desarrollo funcional de las células $T\gamma\delta$. Inspirándose en el modelo de Carding y Egan¹⁵, se ilustra cómo se producen y exportan desde el timo las subpoblaciones de células $T\gamma\delta$ durante la ontogenia. Las cinco subpoblaciones se definen por su capacidad funcional combinada con el uso de genes $V\gamma$ particulares, conformando así distintas ondas de diferenciación en el timo. Adaptado de Haas *et al.*, 2012⁷⁶ y Prinz *et al.*, 2013⁷⁰.

3. LINFOCITOS T $\gamma\delta$ EN RATONES DEFICIENTES DE *Cd3 γ* Y *Cd3 δ*

Cómo se ha detallado con anterioridad en la capítulo 1 de la Introducción, los linfocitos T reconocen antígenos a través de un complejo de superficie celular⁶, denominado TCR, que parece ser clave para entender el desarrollo de estos linfocitos T $\gamma\delta$. En este contexto, se han generado diversos ratones deficientes de *Cd3* (Fig. I7) y se han estudiado pacientes deficientes de esta proteína^{80, 81} con el objetivo de entender el papel de cada cadena dentro del complejo y en el desarrollo del linaje T. Esta tesis ha utilizado la información aportada por estos estudios en humanos y ratones para alterar la disponibilidad de cadenas CD3 en el ensamblaje y transporte a la membrana del receptor y así disminuir la cantidad de complejo en la superficie en ratón.

3.1. DEFICIENCIA ABSOLUTA DE *Cd3*

El TCR ($\alpha\beta$ o $\gamma\delta$) necesita la ayuda de los dímeros CD3 (CD3 $\gamma\epsilon$ y CD3 $\delta\epsilon$) y un sólo homodímero $\zeta\zeta$ invariante (CD247) para desencadenar la respuesta celular^{82, 83}. El heterodímero CD3 consiste en un conjunto de cadenas invariantes que se agrupan de manera no covalente y ayudan, por un lado, a expresar las cadenas TCR y por otro, a transmitir al interior celular la señal de reconocimiento⁶. Se sabe, que este complejo TCR se ensambla en el RE en humanos^{84, 85, 86} y ratones⁸⁷ y posteriormente se exporta a la superficie celular⁸⁷. Es importante destacar que las cadenas que forman el TCR sufren modificaciones post-transcripcionales que incluyen la formación de puentes di-sulfuro y la adición de azúcares (glicosilación) en el RE y aparato de Golgi^{88, 89, 90}. La estequiometría del TCR $\alpha\beta$ /CD3 de membrana, es la misma en humanos y ratones (TCR $\alpha\beta$ /CD3 $\gamma\epsilon\delta\epsilon\zeta\zeta$)⁹¹, pero la del TCR $\gamma\delta$ /CD3 es diferente. En ratón, no incorpora CD3 δ (TCR $\gamma\delta$ /CD3 $\gamma\epsilon\zeta\zeta$), pero sí en humanos (TCR $\gamma\delta$ CD3 $\gamma\epsilon\delta\epsilon\zeta\zeta$)⁷, aunque si se sintetiza en ambos casos⁸².

La ausencia de CD3 δ en ratones refleja parcialmente la situación humana: severa linfocitopenia T $\alpha\beta$ con un bloqueo en DP (en humanos bloqueo en DN) y disminución severa de la expresión TCR $\alpha\beta$ en la superficie celular, asociado con características de SCID y letalidad^{92, 93}. Pero, mientras que los humanos deficientes de CD3 δ carecen de células T $\gamma\delta$, los ratones deficientes de CD3 δ supuestamente no presentan ningún defecto en el desarrollo de este linaje, debido a la diferente estequiometría entre el ser humano y ratón TCR $\gamma\delta$ ^{7, 82} (Fig. I1). Aunque, parece que sí tienen reducida la expresión del TCR $\gamma\delta$, como se puede observar en el artículo original donde se describieron estos ratones deficientes de CD3 δ y donde nunca se abordó este aspecto de la funcionalidad de la cadena CD3 δ ⁹⁴.

La deficiencia de CD3 γ permite el desarrollo de las células T $\gamma\delta$ en humanos⁹⁵ (se seleccionan un número considerable de células T $\gamma\delta$ que expresan niveles altos de TCR $\gamma\delta$ ⁷, aunque con una estequiometría anormal, TCR $\gamma\delta$ /CD3 $\delta\epsilon\delta\epsilon\zeta\zeta$ y una asociación deteriorada de CD247⁹⁶), pero no en ratones (presentan un bloqueo en el desarrollo de las células T $\gamma\delta$ ⁹⁷). Los diferentes fenotipos de células T $\gamma\delta$ entre humanos y ratones deficientes de CD3 γ pueden explicarse por las diferencias en la composición del TCR $\gamma\delta$ ⁷. Los TCR $\gamma\delta$ humanos contienen CD3 $\gamma\epsilon$ y CD3 $\delta\epsilon$ (al igual que TCR $\alpha\beta$), mientras que los TCR $\gamma\delta$ de ratón sólo contienen dímeros CD3 $\gamma\epsilon$ ⁸² (Fig. I1). De hecho la cadena CD3 δ humana, pero no la de ratón, es capaz de reconstituir la expresión de TCR en el ratón deficiente de CD3 γ y CD3 δ ⁹⁸, lo que sugiere importantes diferencias estructurales y/o funcionales entre la cadena CD3 δ de ratón y humana durante desarrollo de las células T $\gamma\delta$. Así, CD3 δ humano es capaz de aportar una impronta de señalización crítica que puede imitar la cadena CD3 γ de ratón. Tomados en conjunto, estos resultados sugieren un papel diferente para

CD3δ en humanos y ratones en relación con el TCRγδ durante el desarrollo de células T. Sin embargo, los mecanismos de selección y expansión de linfocitos pueden diferir entre las especies, ya que algunas inmunodeficiencias muestran también grandes diferencias en comparación con los modelos de ratones². De este modo, los TCRαβ y TCRγδ de ratón difieren drásticamente en su estequiometría, pues no incorporan ningún dímero CD3δε sino, dos dímeros CD3γε⁷. Aunque se sabe que las células Tγδ sí que son capaces de sintetizar esta cadena CD3δ (dímeros) dejando abierta la posibilidad de que tengan un papel crítico en la conformación y estabilidad del complejo TCRγδ en ratones⁸².

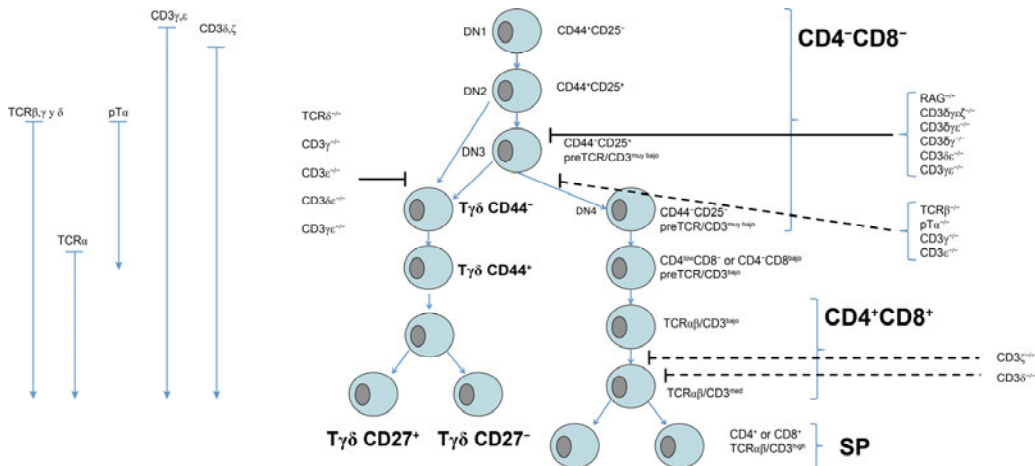


Figura 17. Bloqueo del desarrollo tímico causado por deficiencias de TCR y CD3 en el ratón. Se ilustra los diferentes puntos del bloqueo en el desarrollo de los linfocitos T en el timo (derecha) causado por la deficiencia de componentes del pre-TCR y TCR. Las líneas continuas indican bloqueo total, mientras que las líneas discontinuas indican bloqueo parcial. A la izquierda se muestran los momentos del desarrollo donde comienzan a expresarse los distintos componentes del pre-TCR y TCR. Adaptado de Wang *et al.*, 1999⁹⁹.

3.2. HAPLOINSUFICIENCIA DE *Cd3*

En los últimos años se han analizado varios individuos portadores de mutaciones causantes de inmunodeficiencias de CD3γ y CD3δ basándose en los resultados obtenidos en los deficientes totales¹⁰⁰ (Fig. 18). Aunque se trata de familiares clínicamente sanos, se ha observado que presentan defectos parciales de expresión del TCRαβ y TCRγδ^{100, 101} que se correlacionan con defectos funcionales selectivos del TCR, tal como se ha descrito en otras inmunodeficiencias y ratones deficientes¹⁰². Por ejemplo los ratones heterocigotos para la mutación de la proteína tirosín fosfatasa de la célula T (TC-PTP/PTPN2) que ocasiona patología letal en ratones, aunque sobreviven, presentan distintas alteraciones como el incremento de los niveles de ARNm para distintas citoquinas o colon inflamado¹⁰³. Sin embargo no se ha descrito ningún defecto en ratones haploinsuficientes para CD3, aunque los datos en humanos dejan la puerta abierta a un posible efecto no descrito aún en estos ratones. Por esta razón, intentamos aprovechar las ideas descritas con anterioridad en estos trabajos para posibilitar la generación de un ratón que tuviera afectada selectivamente la expresión del TCRγδ vía interferencia genética de sus componentes.

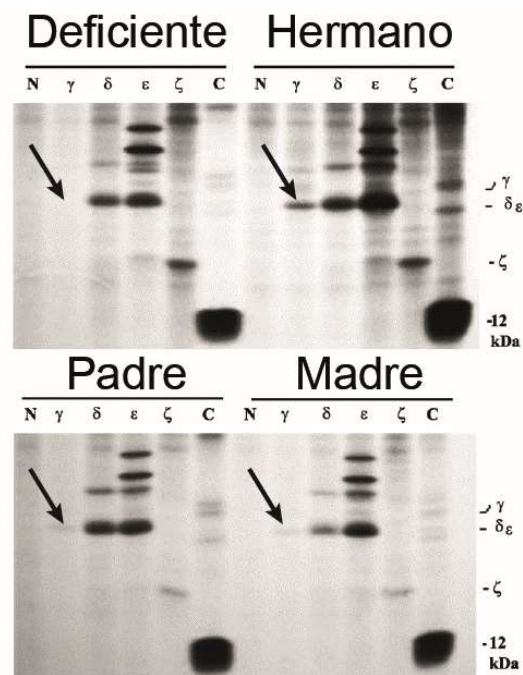


Figura 18. Haploinsuficiencia de *Cd3g* en humanos. Análisis PAGE-SDS de inmunoprecipitados obtenidos a partir de lisados después del marcaje metabólico de líneas de células T del paciente deficiente de CD3γ, hermano, padre y madre. Los antisueros utilizados fueron suero normal de conejo como control negativo (N), anti-CD3δ (δ), anti-CD3ε (ε), anti-CD3ζ (ζ), y anti-CD3γ (γ), y como referencia (C) se muestra anti-β2M, 12 kDa. Las posiciones de las diferentes cadenas se indican a la derecha¹⁰⁰.

OBJETIVOS



OBJETIVO GENERAL

Dentro del estudio de las células $T\gamma\delta$, nos propusimos entender el papel del TCR y la intensidad de su señal transmitida en el desarrollo en el timo de los linfocitos efectores $T\gamma\delta$ pro-inflamatorios (productores $IFN-\gamma$ vs IL-17).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Usando un modelo novedoso de ratones haploinsuficientes dobles para $CD3\gamma$ y $CD3\delta$ ($CD3DH$) se proponen como objetivos particulares los siguientes:

- Análisis comparativo de la expresión y señalización del $TCR\alpha\beta$ y $TCR\gamma\delta$
- Caracterización en el timo del desarrollo de los linfocitos $T\alpha\beta$ y $T\gamma\delta$
- Estudio de la diferenciación en el timo de los subtipos de linfocitos $T\gamma\delta$ efectores (productores de $IFN-\gamma$ o IL-17) y análisis transcripcional de los genes implicados
- Caracterización de los subtipos de linfocitos $T\gamma\delta$ efectores y su relevancia en el desarrollo de patología en un modelo de malaria cerebral

MATERIALES Y MÉTODOS



1. MATERIALES

1.1. MODELOS ANIMALES

Para generar los modelos estudiados en este trabajo, se utilizaron ratones C57BL/6 control (en adelante ratones control o Control) procedentes de los laboratorios Charles Rivers y ratones deficientes de las distintas cadenas CD3 (en adelante KO). Los ratones deficientes de *Cd3g* (CD3 γ KO)⁹⁷, fueron cedidos por el Dr. D Kappes (Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, EEUU). Por su parte, los ratones deficientes de *CD3d* (CD3 δ KO)⁹⁴ fueron cedidos por el Dr. Immanuel Luescher (Ludwig Institute for Cancer Research, Lausanne, Suiza). Para los experimentos con ECM se utilizaron ratones deficientes de células T $\gamma\delta$ (TCR δ KO)¹⁰⁴ cedidos por Dr. Bruno Silva-Santos (Instituto de Medicina Molecular, Lisboa, Portugal). Todos los ratones fueron criados y mantenidos en las instalaciones específicas de animales libres de patógenos del Instituto de Medicina Molecular (Lisboa) y Animalario de la Universidad Complutense (Madrid). Todos los experimentos con animales se realizaron en cumplimiento de las leyes y directrices institucionales y fueron aprobados por los comités de ética locales (en el caso de la UCM, el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid, Madrid). En todos los casos los ratones se mantuvieron separados por genotipo y sexo. Hasta su procesamiento, se proporcionó agua y una dieta *ad libitum* de composición normal para roedor. Las crías se diferenciaban de la madre por tamaño a los 20 días del nacimiento, cuando se producía el destete y cambio de jaula. Los ratones adultos fueron utilizados entre 4-10 semanas de edad.

TABLA M1: RATONES		
	Deficiencia	
	CD3 γ KO	CD3 δ KO
Fondo genético	ES 129 SVJ en blastocistos BL/6	C57BL/6

1.1.1. Haploinsuficiencia simple de *Cd3* (SH)

Los ratones heterocigotos simples se obtuvieron cruzando hembras control de más de 7 semanas de edad con machos KO para cada cadena CD3 de 6 a 10 semanas de edad.

1.1.2. Haploinsuficiencia combinada de *Cd3* (CD3DH)

Los ratones heterocigotos dobles (CD3DH) se obtuvieron cruzando hembras CD3 δ KO de más de 7 semanas de edad con machos CD3 γ KO.

1.1.3. Embriones (embarazos programados)

Para poder estudiar el proceso tímico de las células T $\gamma\delta$ en diferentes momentos del desarrollo del ratón, se establecieron unas pautas que nos permiten conocer con exactitud el momento de gestación de cada embrión (embarazos programados o cronometrados). Se colocaron el macho y hembra juntos (en la jaula del macho) a última hora de la tarde y a la mañana siguiente, a primera hora se chequeaba el posible tapón vaginal de las hembras y se separaban. Este tampón se compone de secreciones coaguladas masculinas y por lo general persiste durante 8-24 h después de la cópula en la vagina de la hembra. La presencia de un tapón vaginal no garantiza el embarazo: sólo indica que se produjo la actividad sexual, pero las hembras con tapón vaginal se marcaron para poder evaluar su posible embarazo. Si la hembra está embarazada, el primer

día de gestación se considera que es el día después de que se encuentra el tapón. Los machos y hembras se colocaban juntos una vez por semana (preferiblemente el mismo día cada semana) para poder diferenciar de una manera adecuada tras 14 días las hembras embarazadas de las no embarazadas y poder ponerlas nuevamente en cruce.

1.1.4. Quimeras de médula ósea

Para poder realizar un estudio de reconstitución competitiva, ratones RAG2KO y TCR δ KO se irradiaron letalmente (900rad) y al día siguiente se les inyectó (intravenosamente) un total de 10^7 de células mixtas de médula ósea (1:1 o 1:9) de origen control (WT.Thy-1.1) y CD3DH (CD3DH.Thy-1.2.) Los ratones quiméricos se conservaron en tratamiento con antibiótico en agua (2% Bactrim) durante las 4 primeras semanas tras la irradiación. Se mantuvieron durante 6 semanas en el animalario con agua y dieta *ad libitum* de composición normal para que reconstituyeran su compartimento hematopoyético antes de que se procesaran los órganos para el análisis de citometría de flujo.

1.2. CÉLULAS

TABLA M2: CÉLULAS		
Nombre	Descripción	Medio crecimiento
Linfocitos/timocitos T primarios	Extraídos de órganos linfoides	RPMI completo
OP9-DL1	Línea celular de estroma de ratón que expresa <i>Delta-like 1</i>	DMEM completo

1.3. APARATOS, CONSUMIBLES Y KITS

TABLA M3: APARATOS, CONSUMIBLES Y KITS	
Aparato	Empresa
Aislador celular Aria I	BD Bioscience
Aislador celular Aria III	BD Bioscience
Citómetro de flujo Accuri	BD Bioscience
Citómetro de flujo FACScalibur	BD Bioscience
Citómetro de flujo Fortessa II	BD Bioscience
Irradiador Gammacell 1000	Nordion
NanoDrop ND-1000 spectrophotometer	Thermo Scientific
Odyssey® Fc	LI-COR
Unidades de electroforesis	Bio-Rad
Unidades de transferencia	Bio-Rad
ViiA 7 Real-Time PCR system	Life Technologies
Consumible	Empresa
Agujas 21G	Becton-Dickinson
Filtro 40µm	BD Falcon
Filtro 70µm	BD Falcon
Guantes	Sempermed
Jeringas	Becton-Dickinson
Membranas de PVDF	Millipore
Pipetas 3 ml desechables	Nunc
Placas de 24 pocillos fondo plano	Nunc
Placas de 6 pocillos fondo plano	Nunc
Placas de 96 pocillos fondo plano	Nunc
Placas de 96 pocillos fondo redondo	Nunc
Placas de cultivo celular	Nunc
Placas de cultivo celular	Nunc

Puntas micropipetas	Eppendorf
Tubos 1'5 ml	Eppendorf
Tubos 15 ml	Nunc
Tubos de citómetro	Nirco
Kit	Empresa
cDNA Synthesis kit	Roche
<i>Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer</i>	eBioscience
RNeasy Mini kit	Qiagen

1.4. ANTICUERPOS PARA CITOMETRÍA

TABLA M4: ANTICUERPOS PARA CITOMETRÍA				
Especificidad	Clon	Fluorocromo	1DB_ID (Identific):	Origen
CD3	145.2C11	PerCPCy5.5	1DB-001-0000264176	eBioscience
CD3	17A2	APC-Cy7	1DB-001-0000263478	eBioscience
CD3	145.2C11	Sin conjugar	1DB-001-0000264178	eBioscience
CD3	17A2	Sin conjugar	1DB-001-0000226069	eBioscience
CD4	GK1.5	FITC	1DB-001-0000263406	eBioscience
CD4	RM4-5	PerCPCy5.5	1DB-001-0000884856	eBioscience
CD5	53-7.3	PE	1DB-001-0000263310	eBioscience
CD8	53.6.7	APC-Cy7	1DB-001-0000263248	eBioscience
CD24	M1/69	PB	1DB-001-0000263563	eBioscience
CD25	PC61	Pe-Cy7	1DB-001-0001017649	eBioscience
CD25	PC61	APC	1DB-001-0001111370	eBioscience
CD25	PC61	APC-Cy7	1DB-001-0001111736	eBioscience
CD27	LG.7F9	PE	1DB-001-0000840049	Biolegend
CD27	LG.7F9	Pe-Cy7	1DB-001-0001111490	eBioscience
CD27	LG.3A10	PerCPCy5.5	1DB-001-0000840053	Biolegend
CD27	LG.7F9	APC	1DB-001-0000840051	Biolegend
CD44	IM7	PE	1DB-001-0000262159	eBioscience
CD44	IM7	PerCPCy5.5	1DB-001-0000838541	Biolegend
CD45RB	16A	PE	1DB-001-0000869761	BDPharmigen
CD62L	MEL-14	APC	1DB-001-0000263293	eBioscience
CD69	H1.2F3	APC	1DB-001-0000264162	eBioscience
CD73	AD2	PE	1DB-001-0000873094	BDPharmigen
CD122	TM-β1	FITC	1DB-001-0000263783	eBioscience
CD122	TM-β1	FITC	1DB-0010000839954	Biolegend
TCRδ	GL3	PE	1DB-001-0000264125	eBioscience
TCRδ	GL3	PerCPCy5.5	1DB-001-0000862611	Biolegend
TCRδ	GL3	BV 421	1DB-001-0000862613	eBioscience
Vγ1	2.11	APC	1DB-001-0001061965	Biolegend
Vγ4	UC3-10A6	FITC	1DB-001-0000884592	BDPharmigen
IFNγ	XMG1.2	PE	1DB-001-0001110823	eBioscience
IL17A	TC11.18H10.1	PB	1DB-001-0000845132	Biolegend
NK1.1	PK136	Pe-Cy7	1DB-001-0000263921	eBioscience
ERK	XMG1.2	PE	1DB-001-0000869045	BDPharmigen
AKT	M89-61	PE	1DB-001-0000871760	BDPharmigen

National Institutes of Health Tetramer Core Facility. Tetrámero mCD1d-PE cargado con el glicolípido PBS57.

1.5. OTROS REACTIVOS

TABLA MS: REACTIVOS	
Reactivo	Empresa
Acrilamida/Bisacrilamida	Sigma-Aldrich
Antibiótico /antimicótico (penicilina G 100U/ml, estreptomicina 100 µg/ml y amfotericina B 0,25µg/ml)	Gibco
anti-IL4	eBioscience
anti-ILCD28	eBioscience
Azul de tripano	Invitrogen
Bactrim	Roche
Biotina {sulfo-NHS-LC-biotina}	Thermo Scientific
Blocking buffer o solución de bloqueo (anti-CD16/CD32)	eBioscience
Brefeldina A	Sigma
BSA	Sigma-Aldrich
CFSE	Sigma-Aldrich
Dimetil sulfóxido (DMSO)	Panreac
DMEM	Gibco
EDTA	Panreac
Etanol	Panreac
FCS	GE Healthcare
Fluo-4/AM	Sigma-Aldrich
HBSS	Gibco
Heparina Hospira 1%	Leo
IL-12	Preprotech
IL-18	Preprotech
IL-1β	Preprotech
IL-2	Preprotech
IL-21	Preprotech
Ionomicina	Sigma-Aldrich
Leche en polvo desnatada	Bio-Rad
Lympholyte {ficoll para ratones}	Cedarlane
Metanol	Gerber-Labo
PBS 10x	Gibco
PMA	Sigma-Aldrich
RBCL buffer	Biolegend
RPMI 1640	Lonza
SDS	Sigma-Aldrich
Tampón de carga 2x reductor para WB	Sigma-Aldrich
TEMED	Sigma-Aldrich
Tween 20	Sigma-Aldrich
β-mercaptoetanol	Sigma-Aldrich

1.6. MEDIOS, TAMPONES Y SOLUCIONES

TABLA M6: MEDIOS, TAMPONES Y SOLUCIONES		
Nombre	Composición	Aplicación
Medio de congelación celular	10% DMSO 45% RPMI 45% FCS	Cultivos celulares
DMEM completo	10% FCS 1% antibiótico/antimicótico 0,1% Gentamicina	Cultivos celulares
DMEM enriquecido	20% FCS	Cultivos OP9-DL1

	1% antibiótico/antimicótico 0,1% Gentamicina	
HBSS completo + Ca^{2+}	10% FCS 1% Glu	Medición calcio intracelular
HBSS completo sin Ca^{2+}	10% FCS 1% Glu	Medición calcio intracelular
RPMI completo	10% FCS 1% antibiótico/antimicótico 0,1% Gentamicina	Cultivos celulares
Tampón de electroforesis	25 mM Tris 192 mM Glicina 0,1% SDS	SDS-PAGE
Tampón de lisis (NP40)	1% NP-40 50 mM Tris-HCl pH 7.4 100 mM NaCl 10% Glicerol 2 mM MgCl_2 1 mM PMSF 1 mM Na_3VO_4 25 mM NaF 1x inhibidores de proteasas	Preparación de extractos celulares
Tampón de transferencia	25 mM Tris 192 mM Glicina 20% Metanol	SDS-PAGE
Gel separador	10-18% Acrilamida 0,1% SDS 375mM TRIS 0,1% APS 0,04% Temed	SDS-PAGE
Gel concentrador	4,5% Acrilamida 0,1% SDS 125mM TRIS 0,1% APS 0,1% Temed	SDS-PAGE
PBS-T	PBS 0,01% Tween2	Western Blot
Tampón de lisis (NP40)	1% NP-40 50 mM Tris-HCl pH 7.4 100 mM NaCl 10% Glicerol 2 mM MgCl_2 1 mM PMSF 1 mM Na_3VO_4 25 mM NaF 1x inhibidores de proteasas	Preparación de extractos celulares
Tampón de transferencia	25 mM Tris 192 mM Glicin 20% Metanol	SDS-PAGE

1.7. HERRAMIENTAS INFORMÁTICAS

TABLA M7: HERRAMIENTAS INFORMÁTICAS	
Programa	Aplicaciones
InDesign CS4 (Adobe)	Maquetación y edición de texto
1degreebio.org	Uso de anticuerpos monoclonales
Cell Quest Pro (BD bioscience)	Adquisición de datos de citometría de flujo
Diva (BD bioscience)	Adquisición de datos de citometría de flujo
Endnote X5 (Thomson Reuters)	Gestor bibliográfico
Excel (Microsoft)	Análisis de datos, estadística y diseño de gráficas
FlowJo (Tree Star)	Análisis de datos de citometría de flujo
GraphPad Prism (GraphPad)	Análisis de datos, estadística y diseño de gráficas
Illustrator CS4 (Adobe)	Diseño de figuras
Image Studio (LI-COR)	Adquisición y análisis de imágenes de WB
ViiA 7 software v1.2	Análisis de los resultados de PCR cuantitativa
R	Software libre para computación y gráficos estadísticos
Word (Microsoft)	Maquetación y edición de texto

2. MÉTODOS

2.1. BIOLOGÍA CELULAR *EX VIVO*

2.1.1. Aislamiento de órganos

Los animales de 4 a 8 semanas de edad se sometieron a eutanasia para extraer el timo, bazo y los ganglios linfáticos axilares y poplíteos, se mantuvieron las condiciones de esterilidad dependiendo del tipo de análisis. La sangre venosa por su parte se obtuvo del seno retroauricular y fue dispensada en tubos con heparina como agente anticoagulante. Los diferentes órganos se colocaron en medio RPMI completo donde fueron macerados y filtrados a través de un poro de 40µm para eliminar agregados. Una vez filtrados, y tras lavar de nuevo con RPMI completo las células de timo y de ganglios estaban listas para el estudio. En el caso de las células de bazo y linfocitos de sangre periférica, hubo que lisar los eritrocitos presentes utilizando el tampón RBCL durante 5 minutos a temperatura ambiente para su posterior análisis o manipulación.

2.1.2. Citometría de flujo y aislamiento celular

Las muestras se adquirieron usando el FACS Fortessa (8/10 colores) con el programa de adquisición de datos DIVA. Estos datos fueron analizados posteriormente con el software FlowJo (Tree star). En los casos que se hayan utilizado células vivas para realizar un análisis posterior (cuando se indique), estas fueron aisladas electrónicamente con el uso de FACS Aria. En todos los experimentos de citometría de flujo se acotó la región de linfocitos según el tamaño y la complejidad de las células de interés. En todos los casos se usaron controles de isotipo adecuados para determinar la tinción basal y la medida de intensidad de fluorescencia que se usa en esta tesis es la media aritmética (MFI).

Marcaje extracelular: Para la tinción de superficie celular, se tomaron $0,2-0,3 \times 10^6$ células/marcaje y se lavaron en 200µl de PBS-0,5% BSA. Las tinciones se realizaron en un volumen final de 50µl a concentraciones saturantes de los anticuerpos indicados (Tabla M4), las diferentes muestras se incubaron a 4°C durante 30 min tras lo cual, se lavaron con PBS-0,5% BSA por dos veces.

Marcaje intracelular: Para la tinción intracelular, las células se fijaron y permeabilizaron con el kit "*Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer*" durante 15-30 min a 4°C en cada paso y en presencia de anti-CD16/CD32 (solución de bloqueo). Finalmente se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con los anticuerpos específicos en tampón de permeabilización tras lo cual, se lavó con PBS-0,5% BSA por 2 veces.

2.1.3. Análisis funcional

2.1.3.1. Producción de citoquinas

Para evaluar la producción de citoquinas, las células fueron estimuladas con PMA (50ng/ml) e ionomicina (1µg/ml), en presencia de Brefeldina A (inhibidor del transporte celular) (10µg/ml) durante 3-4h a 37 °C. Después, las células se lavaron y tiñeron para los marcadores de superficie celular estimados. Posteriormente, se continuó el protocolo indicado para tinción intracelular con los anticuerpos anti-citoquinas específicos, hasta la fijación de las células, todos los pasos

se realizaron en presencia de Brefeldina A (10 µg/ml) para impedir que las células expulsen las citoquinas que sintetizan, haciendo que se acumulen en su interior.

2.1.3.2. Eventos de activación celular

- Como medida de activación temprana, se utilizó la inducción de la expresión en membrana de las proteínas CD69 y CD25 tras activación con anticuerpo. Las células se incubaron a 37°C durante 24h en placa con anti-CD3 (10µg/ml) pegado en sus pocillos a una concentración de 1×10^6 células/ml en RPMI completo y se analizaron por citometría de flujo. Para unir el anticuerpo a placa se incubaron 100µl de anti-CD3 (10µg/ml) en pocillos de una placa p96 o/n a 37°C.
- Para evaluar la fosforilación de moléculas dependientes de la activación del TCR, las células de ganglios linfáticos aisladas se estimularon durante 5 min a 37°C y en agitación con anti-CD3 soluble (10µg/ml), tras lo cual se continuó el protocolo indicado para tinción intracelular con los anticuerpos anti-moléculas fosforiladas específicas, intentando que transcurriera el menor tiempo posible entre el estímulo y la fijación.
- Para la determinación del calcio intracelular se utilizó el indicador Fluo-4/AM, que es un derivado éster del fluo-4 no fluorescente y permeable a la membrana celular. Una vez dentro de la célula es hidrolizado y se convierte en un compuesto impermeable a la membrana plasmática emitiendo fluorescencia al unirse a los iones de Ca^{2+} (emite a 526 nm). Aproximadamente 0.5×10^6 células se lavaron e incubaron con Fluo-4AM (10µM, 45 min, 37°C en agitación) en medio HBSS sin Ca^{2+} . Posteriormente las células se lavaron con HBSS+ Ca^{2+} y se resuspendieron en este mismo medio, se realizó un marcaje extracelular como los descritos y se preincubó en hielo con 10µg/ml de anticuerpo anti-CD3 biotinilado. Se analizó en el citómetro, tras 30 segundos se añadió estreptavidina y se incubó 1min a 37°C para amplificar la señal de activación y continuar su análisis citométrico.

2.1.3.3. Polarización Th1

Para la polarización Th1, células $\text{CD4}^+ \text{T}\alpha\beta$ vivas se aislaron por citometría de flujo y se incubaron durante 4 días en la placa de fondo redondo con anti-CD3ε y anti-CD28 (5 ng/ml cada uno). Cuando se indica (cóctel Th1), se añadieron las siguientes citoquinas y anticuerpos neutralizantes al medio de cultivo: IL-2 (10 ng/ml), IL-12 (50 ng/ml) y anti-IL-4 (11B11) (10 ng/ml). Transcurrido este tiempo, se lavaron las células con PBS y se analizó la síntesis de IFN-γ por citometría de flujo intracelular.

2.1.4. Desarrollo *in vitro* (en el sistema OP9-DL1)

Las células OP9-DL1 se han descrito como un sistema que permite la generación de linfocitos T a partir de células madre embrionarias o hematopoyéticas *in vitro*¹⁰⁵. Para ello timocitos DN ($\text{CD4}^- \text{CD8}^-$) $\text{CD3}^- \text{TCR}\gamma\delta^-$ se clasificaron en función de su estadio de maduración y se aislaron las células que en el momento de análisis se encontraban en DN2/DN3 ($\text{CD44}^+ \text{CD25}^+$ y $\text{CD44}^- \text{CD25}^+$). Estos progenitores fueron co-cultivados con OP9-DL1 durante un periodo que oscilaba entre una y dos semanas en presencia del cóctel de citoquinas indicado (con cambio de medio de cultivo cada 5 días). Tras este periodo se realizó una tinción por citometría extracelular de las células resultantes o se estimularon para evaluar la capacidad de producción de citoquinas de los mismos.

2.2. BIOLOGÍA MOLECULAR

2.2.1. PCR en tiempo real

El ARN total se extrajo usando el kit *RNeasy Mini* según las instrucciones del fabricante. La concentración y la pureza se determinaron utilizando el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000. El ARN total se transcribió de forma inversa en ADNc usando un kit de *Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis*. Para la PCR cuantitativa a tiempo real se utilizó el ViiA 7 Real-Time PCR. Los cebadores se diseñaron de forma manual o mediante el uso de la herramienta virtual de diseño de cebadores de Roche (www.roche-applied-science.com). El análisis de los resultados cuantitativos de PCR se realizó utilizando el software v1.2 ViiA. En el caso de los estudios de ganancia de función mediada por TCR, antes de la extracción del ARN total, los timocitos T $\gamma\delta$ totales de ratón se estimularon con cantidades saturantes de mAb anti-CD3 durante 16 horas a 37 °C en placa de fondo redondo a una concentración de 0.2×10^6 células/ml en RPMI sin suero.

2.2.2. Microarrays

Todo el análisis de datos de microarrays se realizó utilizando R y varios paquetes disponibles de CRAN (<https://cran.r-project.org/>) y Bioconductor¹⁰⁶. Los datos en bruto (archivos .cel) se normalizaron y se resumieron con el método *Robust MultiArray Average* implementado en el *package 'oligo'*. Las variaciones en los niveles de expresión génica se determinaron utilizando el paquete 'limma'¹⁰⁷ y sólo los genes con el factor de cambio más alto que dos fueron considerados para el análisis *downstream*.

2.3. MODELOS *IN VIVO*

2.3.1. Infección por malaria

Los esporozoitos *P. berghei* ANKA (Pb) WT que expresan GFP se obtuvieron mediante la disección de los mosquitos *Anopheles stephensi* infectados por criadas en el Instituto de Medicina Molecular. Para todos los experimentos con *P. berghei*, se utilizó la cepa ANKA¹⁰⁸, los ratones fueron inyectados por vía intravenosa con esporozoitos. La infección por picadura de mosquito se realizó con diez mosquitos por ratón. La presencia de parásitos en fase eritrocítica se controló mediante análisis de células activadas por fluorescencia (FACS). Para las mediciones FACS, una gota de sangre en $1 \times$ PBS se utilizó para medir la parasitemia sanguínea. Tras la inyección los animales se mantuvieron en el animalario en condiciones normales, un grupo fue observado cada día desde el día 5 post-infección hasta el día 20 donde fueron sacrificados para establecer la curva de supervivencia y otro grupo se sacrificó y analizó a los 5 días post-infección para evaluar la respuesta proinflamatoria.

2.3.2. Tratamiento con anticuerpo anti-CD3 *in vivo*

Para la aplicación de manera sistémica de un anticuerpo contra la cadena CD3 durante el desarrollo tímico en adultos¹⁰⁹ se aplicó de manera intraperitoneal una inyección con 40 μ g de anticuerpo antiCD3 (17A2 puro) en un total de 500 μ l de PBS. Al mismo tiempo se inyectaron 500 μ l de PBS únicamente a un grupo control. Tras la inyección los animales se mantuvieron en el animalario en condiciones normales y fueron sacrificados a los 5 días después de la inyección para el análisis de sus órganos por citometría de flujo extracelular.

2.4. BIOQUÍMICA

2.4.1. Lisados celulares

Los extractos celulares se obtuvieron lavando las células con PBS y lisándolas posteriormente con el tampón de lisis (NP40) durante 30min en hielo. Posteriormente se centrifugaron los extractos a 30.000g durante 15min a 4°C, para eliminar los restos de membranas. Para cuantificar la concentración de proteínas, se utilizó el método de Lowry.

2.4.2. Western Blot

Se cargaron 40µg de proteína por calle, las muestras se mezclaron con tampón de carga para WB y se incubaron 5min a 95°C con tampón reductor. Las muestras fueron separadas mediante electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE). Se prepararon geles a distintos porcentajes (12-18%) de acrilamida dependiendo del tamaño de la proteína de cada análisis. Tras la electroforesis se transfirieron las proteínas a membranas de PVDF mediante transferencia semi-seca. Las proteínas de interés se detectaron por *immunoblot*: en primer lugar se bloquearon las uniones inespecíficas incubando las membranas con PBS 5% leche o BSA, posteriormente se incubó con el anticuerpo primario, se lavó con PBS-T, se incubó con el anticuerpo secundario, se lavó y se reveló. Las incubaciones con los anticuerpos se llevaron a cabo en PBS 0,5% leche o BSA. Para el revelado de las membranas se usaron anticuerpos secundarios unidos a HRP o unidos a fluorocromos, en el caso de los secundarios-HRP se reveló usando reactivo ECL.

2.4.3. Evaluación de la cadena CD3δ en la superficie celular

Para evaluar la presencia de la cadena CD3δ en la superficie de los linfocitos Tγδ, se adaptó un experimento de bloqueo ya descrito sobre los diferentes dímeros de CD3 con la ayuda de un anticuerpo monoclonal¹¹⁰. En primer lugar se bloquearon todos los dímeros CD3γε de la superficie de las células T con la ayuda de anticuerpo específico sin marcar (el clon 17A2 se une exclusivamente a CD3γε). Posteriormente se realizó una tinción con un anticuerpo conjugado con especificidad tanto para los dímeros CD3δε como para los dímeros CD3γε (clon 2C11). Por lo tanto, sobre un bloqueo eficiente de todos los dímeros CD3γε, cualquier tinción secundaria con el anticuerpo 2C11 es indicativo de la presencia de CD3δ en los complejos presentes en la superficie celular. Las tinciones se realizaron siguiendo el protocolo indicado para tinción extracelular con los distintos anticuerpos citoquinas específicos.

2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La significación estadística de las diferencias entre las poblaciones fue analizada con el Student's t-test; como prueba de tipo paramétrico para aquellas variables que siguen una distribución normal (los datos se agruparon en una distribución normal con la misma varianza entre grupos) y se representaron como SD (Desviación estándar). De este modo, P valores menores de 0,05 fueron considerados como significativos (* P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001, como se indica en el pie de cada figura). El tamaño de muestra de las poblaciones fue seleccionado para asegurar la significación del test, en ningún caso se excluyeron datos del análisis.

RESULTADOS



1. DESARROLLO TÍMICO DE LAS CÉLULAS T $\gamma\delta$ EN RATONES CD3DH

Con el objetivo de encontrar un modelo animal para la reducción de expresión del TCR $\gamma\delta$ en superficie que interfiriera en la señalización vía TCR $\gamma\delta$ *in vivo* se analizaron distintas líneas de ratones haploinsuficientes simples y dobles para CD3. Así, se observó un fenotipo característico en un ratón doble heterocigoto para CD3 γ y CD3 δ (CD3DH) que se reveló selectivo para las células T $\gamma\delta$ y que no se observaba en ratones haploinsuficientes simples para CD3 γ y CD3 δ (Fig. R1).

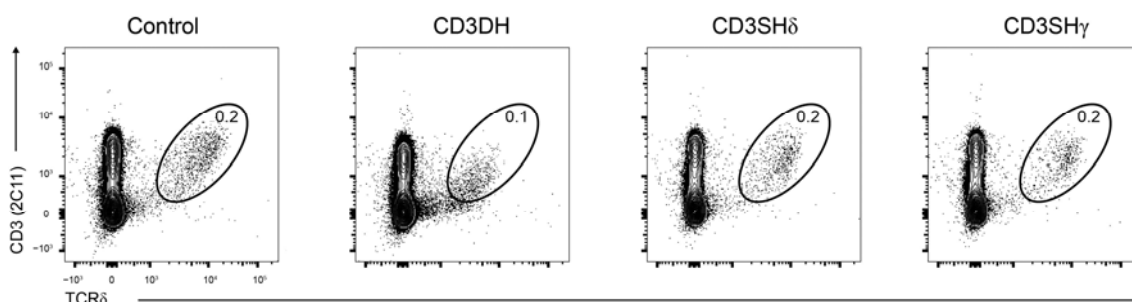


Figura R1. Niveles de expresión característica del TCR $\gamma\delta$ en ratones haploinsuficientes. Se analizó la expresión de CD3 y TCR δ en ratones portadores de mutación en las distintas cadenas de CD3, de izquierda a derecha: ratón control, ratón con haploinsuficiencia combinada de *Cd3g* y *Cd3g* (CD3DH), ratón haploinsuficiente simple para *Cd3d* (CD3SH δ) y ratón haploinsuficiente simple para *Cd3g* (CD3SH γ). Los números dentro de la región seleccionada representan el porcentaje sobre el total de linfocitos.

1.1. REDUCCIÓN SELECTIVA DE LA EXPRESIÓN DEL TCR $\gamma\delta$ Y DEL NUMERO DE TIMOCITOS T $\gamma\delta$

Analizando en profundidad el fenotipo observado en los ratones CD3DH, se observó que estos sufrían una marcada reducción en la expresión de TCR $\gamma\delta$ en superficie de células T $\gamma\delta$ (medida con anticuerpos monoclonales). En cambio, la población T $\alpha\beta$ presentaba unos niveles de expresión dentro de la normalidad para estos marcadores (se observa una cierta tendencia a la reducción que no llega a ser significativa) (Figs. R1 y R2a). Este hecho pone de manifiesto que los ratones CD3DH presentan un defecto selectivo en células T $\gamma\delta$, además se comprobó que el desarrollo tímico de las células T $\alpha\beta$ se mantenía como en los controles (Fig. R2d) y que las células T $\alpha\beta$ dependientes de una selección agonista fuerte para su desarrollo, como pueden ser Treg y células NKT restringidas para CD1d¹¹¹ se encontraban en números similares (Fig. R2g y R2h). Así, también se comprobó como el número total de células T $\gamma\delta$ estaba disminuido (Fig. R2c) pero no el de T $\alpha\beta$ (Fig. R2f), siendo consistente con el modelo de intensidad de la señal para la selección de linaje T $\alpha\beta$ o T $\gamma\delta$ ^{45, 46}. Estos datos en su conjunto sugieren que el umbral de señalización máximo vía TCR $\gamma\delta$ está reducido en los ratones CD3DH, explicando así el defecto selectivo en células T $\gamma\delta$ y no en T $\alpha\beta$.

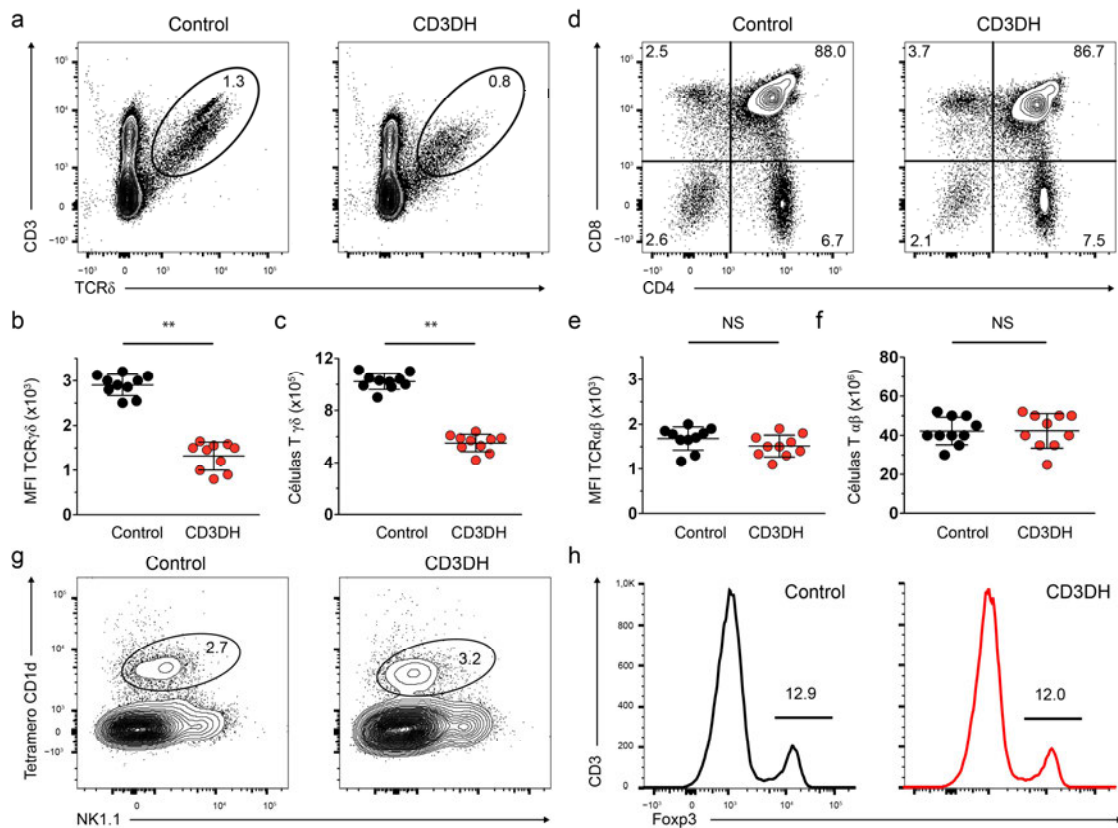


Figura R2. Reducción selectiva de la expresión del TCR $\gamma\delta$ y del número de linfocitos T $\gamma\delta$. (a) Análisis por citometría de flujo extracelular de CD3 vs TCR δ en timocitos de ratones control o dobles heterocigotos (CD3DH) de una semana de edad ($n \geq 10$ por grupo). Los números dentro de la región seleccionada representan el porcentaje sobre el total de linfocitos. (b) MFI de TCR $\gamma\delta$ en timocitos CD3 $^{+}$ TCR δ^{+} seleccionados como en (a). (c) Números absolutos de timocitos T $\gamma\delta$ seleccionados como en (a). (d) Fenotipo CD4 vs CD8 de timocitos totales en ratones control o CD3DH ($n \geq 3$ por grupo). Los números indican porcentaje de células en cada cuadrante. (e) MFI de TCR $\alpha\beta$ en timocitos CD3 $^{+}$ TCR β^{+} . (f) Números absolutos de timocitos T $\alpha\beta$ seleccionados como en (e). (g) Análisis comparativo de células NKT TCR β^{+} CD1d $^{+}$ en ratones control y CD3DH. Los números dentro de la región seleccionada representan el porcentaje sobre el total de linfocitos TCR β^{+} . (h) Análisis comparativo de las células Treg CD4 $^{+}$ Foxp3 $^{+}$ en ratones control y CD3DH. Los números sobre la región seleccionada representan el porcentaje sobre el total de linfocitos CD4 $^{+}$. Los datos mostrados en (b), (c), (e) y (f) representan la media \pm SD. Cada símbolo indica un ratón. NS, no significativo; ** $P < 0.01$ (prueba t de Student).

También se comprobó que los timocitos T $\gamma\delta$ CD3DH se mantuvieron en general como CD4 $^{-}$ CD8 $^{-}$ (DN), lo que supone inequívocamente la exclusión de la desviación hacia el linaje T $\alpha\beta$ en este modelo (Fig. R3).

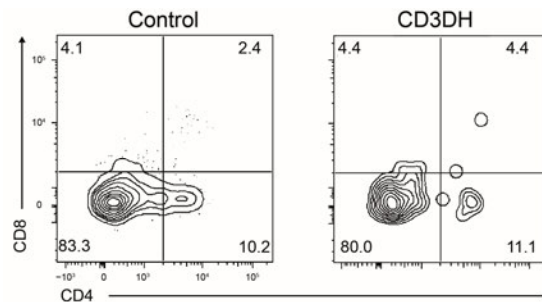


Figura R3. Expresión CD4 vs CD8 característica en el timo de linfocitos T $\gamma\delta$. Análisis por citometría de flujo extracelular de CD4 vs CD8 en timocitos seleccionados como CD3 $^{+}$ TCR δ^{+} para ratones adultos control y CD3DH. Los números indican porcentaje de células en cada cuadrante.

1.2. IMPACTO DE LA DEFICIENCIA ABSOLUTA O PARCIAL DE CD3 δ EN LA EXPRESIÓN DEL TCR $\gamma\delta$

Una vez analizadas las consecuencias de la interferencia del TCR $\gamma\delta$ *in vivo* sobre las células T $\gamma\delta$ en general, se quiso entender por qué una haploinsuficiencia combinada de *Cd3g* y *Cd3d* (CD3DH) tiene un defecto selectivo de expresión del TCR $\gamma\delta$. Parece contradictorio atendiendo a la bibliografía relevante, pues se piensa que el TCR $\gamma\delta$ de ratón no incorpora CD3 δ ⁹⁴, aunque se sabe que las células T $\gamma\delta$ son capaces de sintetizar dicha cadena⁸² y en cantidades similares a lo que lo hacen las células T $\alpha\beta$, sin embargo se desconoce si la formación/estabilidad de los dímeros CD3 $\delta\epsilon$ está alterada o se excluyen durante el ensamblaje del TCR en linfocitos T $\gamma\delta$ ¹¹².

1.2.1. Expresión del TCR $\gamma\delta$ en el timo

En primer lugar se examinó el manuscrito que describe por primera vez el ratón deficiente de CD3 δ , donde se postula que la cadena CD3 δ no está presente en el complejo TCR $\gamma\delta$ en superficie. Se puede comprobar no obstante, cómo las células T $\gamma\delta$ de estos ratones CD3 δ KO presentan unos niveles de expresión del TCR $\gamma\delta$ reducidos en la superficie de sus timocitos⁹⁴. Este análisis es reproducible en nuestro laboratorio (Fig. R4), lo que sugiere que, aunque la cadena CD3 δ se excluya de la mayoría de los complejos TCR $\gamma\delta$ de superficie, su ausencia tiene un impacto desconocido sobre su expresión. Cabe destacar que la expresión del TCR $\gamma\delta$ en los ratones CD3DH se reveló incluso menor que en los ratones CD3 δ KO (Fig. R4) lo que pone de manifiesto, sin duda, el papel estructural de la cadena CD3 γ en las células T $\gamma\delta$ de ratón.

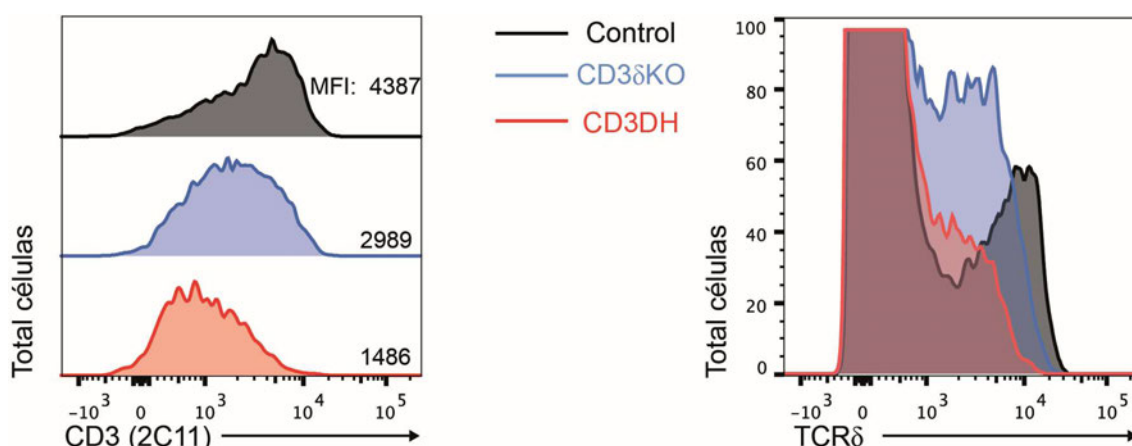


Figura R4. Impacto de la ausencia de CD3 δ en células T $\gamma\delta$ de distintos modelos deficientes de CD3. Análisis por citometría de flujo extracelular de timocitos T $\gamma\delta$ adultos en ratones control, CD3 δ KO y CD3DH. Expresión de CD3 (izquierda) y expresión de TCR δ (derecha) (MFI en ambos casos) en timocitos seleccionados como CD3⁺ TCR δ ⁺, respectivamente, a partir de los ratones adultos indicados (n = 3 por grupo). Los números sobre los ejes indican el valor de MFI.

Entendemos que este impacto desconocido de la cadena CD3 δ sobre la expresión del complejo podría darse a dos niveles diferentes: 1) CD3 δ podría ser necesaria para la señalización de ciertos complejos en la superficie de algunos subgrupos específicos de células T $\gamma\delta$ (papel extracelular) o 2) podría ocurrir que la cadena CD3 δ intracelular sintetizada interviniera en el ensamblaje y estabilidad del TCR $\gamma\delta$ (papel intracelular).

1.2.1.1. Expresión extracelular de CD3 δ

Para evaluar papel de la cadena CD3 δ en la superficie de los linfocitos T $\gamma\delta$, se realizó un sencillo experimento de bloqueo sobre dímeros sin CD3 δ (CD3 $\gamma\epsilon$) para revelar posteriormente los dímeros portadores de CD3 δ (CD3 $\delta\epsilon$). Este método fue descrito en 2010 y consiste en el bloqueo

de los dímeros $CD3\gamma\epsilon$ con la ayuda de un anticuerpo monoclonal (17A2 o 2C11)¹¹⁰. En nuestro caso, nos beneficiamos de la unión diferencial de estos anticuerpos anti-CD3 y utilizamos exclusivamente el bloqueo con el anticuerpo monoclonal (17A2), específico para el dímero $CD3\gamma\epsilon$. Sobre esta situación cualquier tinción con otro anticuerpo monoclonal que reconozca $CD3\epsilon$ como es 2C11, revelará la presencia de un dímero $CD3\delta\epsilon$ en la superficie. Tras bloquear los dímeros $CD3\gamma\epsilon$, se puede comprobar como la tinción con 2C11, no revela diferencias sustanciales en cuanto la presencia de células $T\gamma\delta$ entre los ratones control, los ratones $CD3\delta KO$ (ausencia total de la cadena $CD3\delta$) y $CD3DH$ (Fig. R5). Esto demuestra que ningún subgrupo de timocitos $T\gamma\delta$, aunque sea muy minoritario, expresa $CD3\delta$ en los complejos $TCR\gamma\delta$ de la superficie y excluye su posible papel extracelular en los linfocitos $T\gamma\delta$.

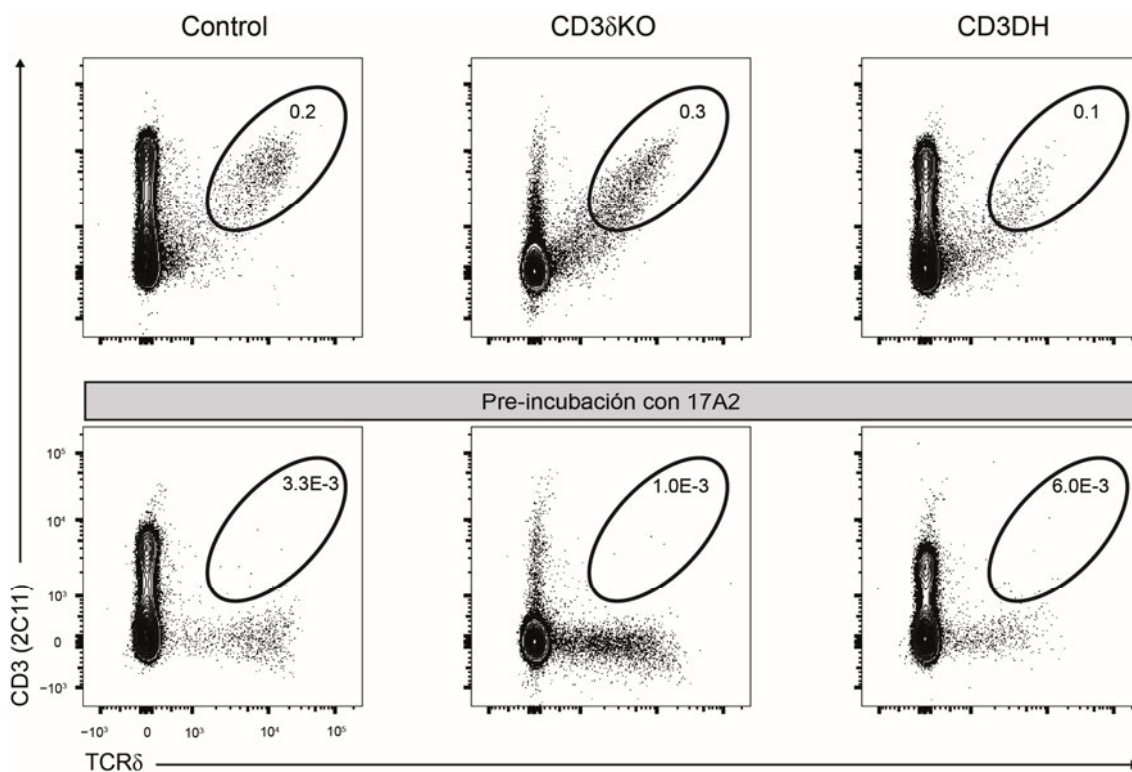


Figura R5. Evaluación de la presencia de $CD3\delta$ en la superficie de células $T\gamma\delta$. Parte superior, se analizaron para la expresión de CD3 (clon 2C11) y $TCR\delta$ diferentes ratones portadores de mutación en las distintas cadenas de CD3, de izquierda a derecha: ratón control, ratón deficiente total de $CD3\delta$ ($CD3\delta KO$) y ratón doble haploinsuficiente de $CD3\gamma$ y $CD3\delta$ ($CD3DH$). Parte inferior, se bloquearon con mA b los linfocitos de los distintos ratones (clon 17A2 que se une al dímero $CD3\gamma\epsilon$) y posteriormente se procedió como en (a). Los números dentro de la región seleccionada representan el porcentaje sobre el total de linfocitos.

1.2.1.2. Expresión intracelular de $CD3\delta$

Descartada la posibilidad de que la cadena $CD3\delta$ se exprese en la superficie de los linfocitos $T\gamma\delta$ y teniendo en cuenta que la cantidad de esta cadena sintetizada en células $T\gamma\delta$ y $T\alpha\beta$ es similar⁸², se quiso evaluar un posible papel a nivel intracelular de la cadena $CD3\delta$. Podría suceder que la ausencia de $CD3\delta$ estuviera afectando al ensamblaje del complejo $TCR\gamma\delta$ (posiblemente a nivel inmaduro, pues no se ha revelado ningún papel en el complejo maduro hasta la actualidad). Relacionado con esto, se ha observado que la cadena $CD3\delta$ presenta una movilidad electroforética diferencial en los ratones $CD3DH$ comparado con los ratones control y heterocigotos simples en linfocitos T totales tanto en timo como en periferia (Fig. R6). Como una primera hipótesis podría considerarse que la cadena $CD3\delta$ se encuentra diferencialmente

glicosilada en los ratones CD3DH, ya que sabemos que se han descrito defectos de glicosilación en la cadena CD3 δ ^{96, 98} previamente.

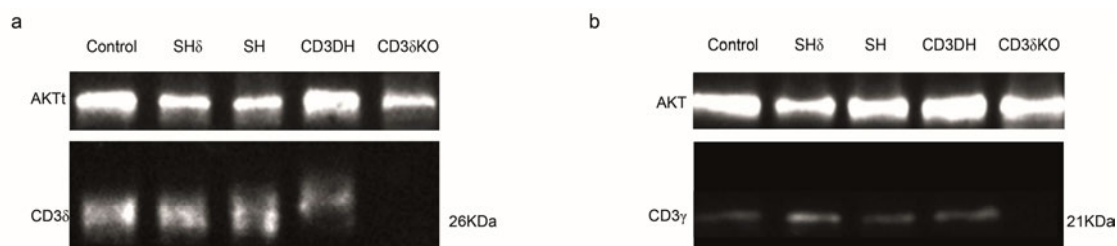


Figura R6. Peso molecular diferencial de la cadena CD3 δ en situaciones de haploinsuficiencia combinada (CD3DH). (a) Electroforesis en geles de acrilamida al 18% en condición desnaturalizante y revelado con anti-CD3 δ policlonal (1:200). (b) Se realizó el WB en las mismas condiciones que (a) pero en este caso se utilizó un anticuerpo anti-CD3 γ . En la parte superior se indicaba el modelo de ratón analizado en cada caso. El peso molecular de cada cadena, se indica a la derecha de cada figura.

En caso de que se confirmara esta glicosilación diferencial, de alguna manera este defecto podría interferir en el ensamblaje y estabilidad del complejo TCR $\gamma\delta$ y en último caso, reducir la expresión del complejo en superficie.

1.3. REDUCCIÓN DE LA SEÑALIZACIÓN VÍA TCR $\gamma\delta$

Para comprobar si una disminución en la expresión del TCR $\gamma\delta$ en superficie también implicaba una reducción en la señalización a través del TCR $\gamma\delta$ en timocitos CD3DH, se estudió la expresión de algunos marcadores de superficie relacionados con selección agonista y experiencia antigénica. En todos los casos estudiados se observó que las células T $\gamma\delta$ del ratón CD3DH presentan una marcada disminución en la expresión de dichos marcadores (Fig. R7) (CD73: marcador de señalización vía TCR durante el desarrollo tímico¹¹³. CD5: indicador estable de intensidad de la señal vía TCR^{114, 115}. CD122 y CD44: marcadores de maduración¹³).

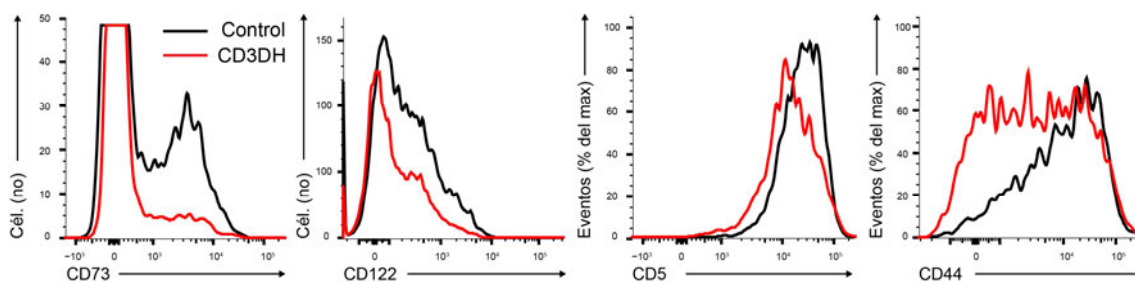


Figura R7. Expresión de marcadores de selección agonista y maduración en linfocitos T $\gamma\delta$ de ratones CD3DH. Expresión superficial de marcadores de selección agonista y de maduración CD73, CD5, CD44 y CD122 en timocitos seleccionados CD3⁺ TCR δ ⁺ CD27⁺ de los ratones indicados.

Además del estado basal anterior (entendido como ausencia de activación dependiente de TCR), también se comprobó que diversos indicadores de la intensidad de la señal tras activación dependiente de TCR estaban disminuidos. Por ejemplo, tras activación con anticuerpo anti-CD3 pegado a placa se comprobó cómo los marcadores de activación temprana CD69 y CD25 se encontraban alterados, también se analizó la fosforilación de moléculas que se encuentran por debajo del TCR y son dependientes de este complejo, cómo es el caso de ERK y AKT y la movilización de calcio intracelular tras activación vía TCR (Fig. R8). Por lo tanto, con estos resultados, se demuestra que la disminución selectiva en la expresión del TCR $\gamma\delta$ también implica una reducción en la señalización TCR $\gamma\delta$ en timocitos CD3DH.

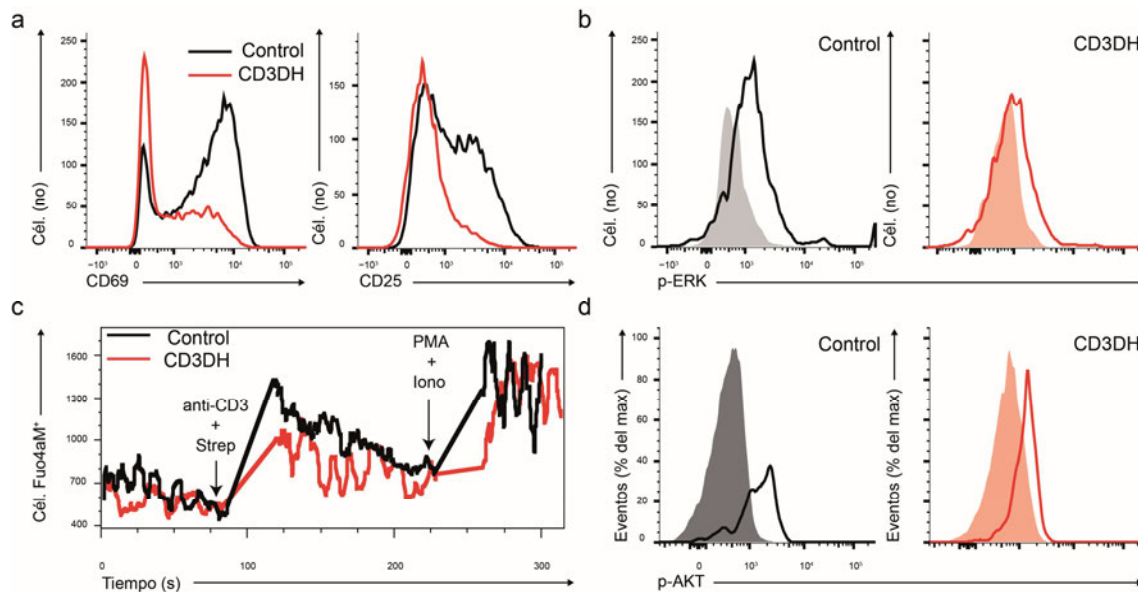


Figura R8. Expresión de marcadores de activación en linfocitos Tγδ de ratones CD3DH. (a) Inducción de CD69 y CD25 en células CD3⁺ TCRδ⁺ CD27⁺ aisladas de bazo y estimuladas con mAb anti-CD3 pegado a placa durante 24h. (b) Inducción de Erk1/Erk2 fosforilados en células de ganglios linfáticos CD3⁺ TCRδ⁺ CD27⁺ en los ratones indicados y estimuladas durante 5 min con mAb anti-CD3 soluble (10 g/ml) (curva vacía). La curva rellena representa la tinción con el anticuerpo de control de isotipo correspondiente. (c) Movilización de Ca²⁺ intracelular tras estímulo con mAb anti-CD3 soluble y PMA+Iono en células de ganglio linfático CD3⁺ TCRδ⁺ CD27⁺ de los ratones indicados. (d) Inducción de Akt fosforilados en células de ganglios linfáticos CD3⁺ TCRδ⁺ CD27⁺ en los ratones indicados y estimuladas durante 5 min con mAb anti-CD3 soluble (10 μg/ml) (curva vacía). La curva rellena representa la tinción con el anticuerpo de control de isotipo correspondiente.

1.4. RECONSTITUCIÓN COMPETITIVA (DEFECTO INTRÍNSECO)

Una vez caracterizado el defecto en los ratones CD3DH se analizó si el efecto observado era un efecto intrínseco, debido a la alteración de los componentes del TCR o se trataba un efecto extrínseco, originado por algún efecto compensatorio o por desarrollarse en un nicho con un menor número de células (incompleto). Todo ello sugería un enfoque de reconstitución competitiva donde las células CD3DH se pudieran desarrollar en presencia de células Tγδ totalmente normales (e interactuar con ellas) y en un nicho completo, para comprobar, si alguno de los defectos observados en CD3DH serían reproducibles bajo estas circunstancias. Para ello se realizaron dos tipos de aproximaciones, ratones RAG2KO y TCRδKO irradiados se reconstituyeron con precursores hematopoyéticos de origen control (WT.Thy-1.1) y CD3DH (CD3DH.Thy-1.2) a concentraciones diferentes (1:1 o 1:9). Los ratones quiméricos se analizaron tras 6 semanas, tiempo suficiente para que reconstituyeran su compartimento hematopoyético. Dicho análisis muestra por una parte que se mantiene el defecto de expresión del TCRγδ (Fig. R9a) y por otra que los progenitores de CD3DH son superados selectivamente por los precursores de los ratones control durante el desarrollo Tγδ (las células Tγδ que se desarrollan son en su mayoría WT.Thy-1.1 cuando se usa un ratio 1:1, independientemente del hospedador), pero no durante el desarrollo de células Tαβ (las células CD4⁺ se desarrollan en igual número cuando se usa un ratio 1:1, independientemente del hospedador) (Fig. R9b). Cabe destacar que esta desventaja puede ser corregida usando la proporción 1:9 (WT:CD3DH) referente a precursores hematopoyéticos, lo que demostraría la viabilidad y capacidad de los progenitores CD3DH para generar timocitos Tγδ (aunque reducida si lo comparamos con progenitores control).

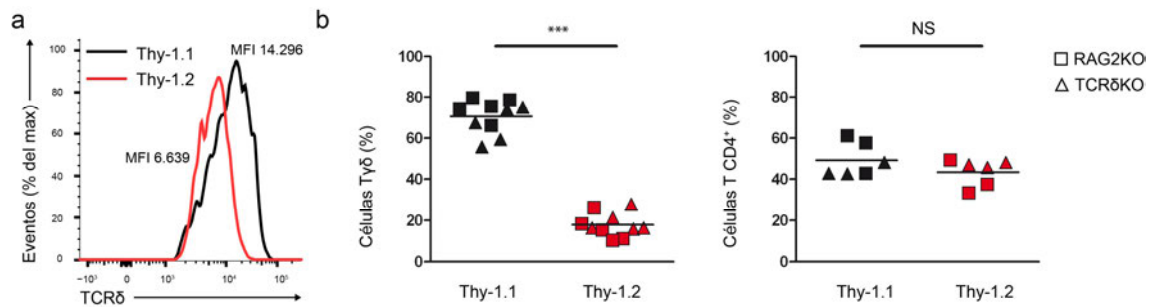


Figura R9. Reconstitución competitiva con precursores hematopoyéticos de origen WT.Thy1.1 y CD3DH.Thy1.2 (1:1). (a) Citometría de flujo extracelular para la expresión de TCRγδ en timocitos de origen WT.Thy1.1 (negro) o CD3DH.Thy1.2 (rojo) en un ratón hospedador RAG2KO. (b) Fracciones de células Thy1.1 vs Th1.2 en timocitos CD3⁺ TCRδ⁺ o CD3⁺ CD4⁺. Cada símbolo indica un ratón hospedador, ya sea RAG2KO (cuadrado) o TCRδKO ratón (triángulo). Los datos mostrados en (b) representan la media ± SD. NS, no significativo; ***P < 0.001 (prueba *t* de Student).

2. DESARROLLO DIFERENCIAL DE TIMOCITOS $T\gamma\delta$ EFECTORES EN RATÓN CD3DH

Las células $T\gamma\delta$ capaces de producir IFN- γ e IL-17 pueden distinguirse y ser reguladas desde el estado embrionario hasta el estado adulto por el miembro de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral CD27⁴⁹, aunque en la actualidad existen otros marcadores que están directamente relacionados con la expresión de estas citoquinas^{14, 37, 50}. También se sabe, que las distintas “ventanas/ondas” de desarrollo donde se producen estos progenitores están ligadas al uso de diferentes elementos $V\gamma$ (Fig. 16). Por esta razón se decidió analizar el desarrollo de estas poblaciones efectoras en el timo basándonos en el uso combinado de CD27 en superficie y de diferentes tipos de $V\gamma$.

2.1. ANÁLISIS *EX VIVO*

En primer lugar se comprobó que el desarrollo de las células $T\gamma\delta$ CD27⁺ y $T\gamma\delta$ CD27⁻ en el timo de los ratones CD3DH comparado con el control era normal en relación a su porcentaje dentro del total $T\gamma\delta$ (Fig. R10a, diferentes tiempos del desarrollo embrionario, como se marca a la izquierda de la figura). Pero al segregar estas subpoblaciones (CD27⁺ vs CD27⁻) según el uso de los diferentes elementos $V\gamma$, observamos que alrededor del nacimiento, en el ratón CD3DH se reduce la población $V\gamma 4^+$ CD27⁺. Sin embargo la población $V\gamma 4^+$ CD27⁻ se mantiene como en los controles (en cuanto a porcentajes ya que es difícil discutir números absolutos, pues el total de células $T\gamma\delta$ se encuentra disminuido en los ratones CD3DH) (Fig. R10b). Este hecho recuerda el efecto descrito sobre las células $T\gamma\delta$ T10/T20 específicas que se desarrollan en presencia (ratones control) o en ausencia de su ligando (ratones $\beta 2mKO$) y presentan un uso exclusivo de $V\gamma 4$ ^{37, 55, 116, 117}. Los linfocitos $T\gamma\delta$ que se desarrollaban en presencia de ligando eran capaces de adquirir una impronta IFN- γ característica (igual que las células CD3DH $V\gamma 4^+$ CD27⁺), mientras que las células que se desarrollaban en ausencia de ligando producen IL-17 (igual que las células CD3DH $V\gamma 4^+$ CD27⁻)³⁷. Lo que sugiere que algunos subgrupos específicos de células $T\gamma\delta$ necesitan tanto interacción con el ligando específico como unas características intrínsecas determinadas del receptor para generar una intensidad de la señal determinada y adquirir un destino efector característico.

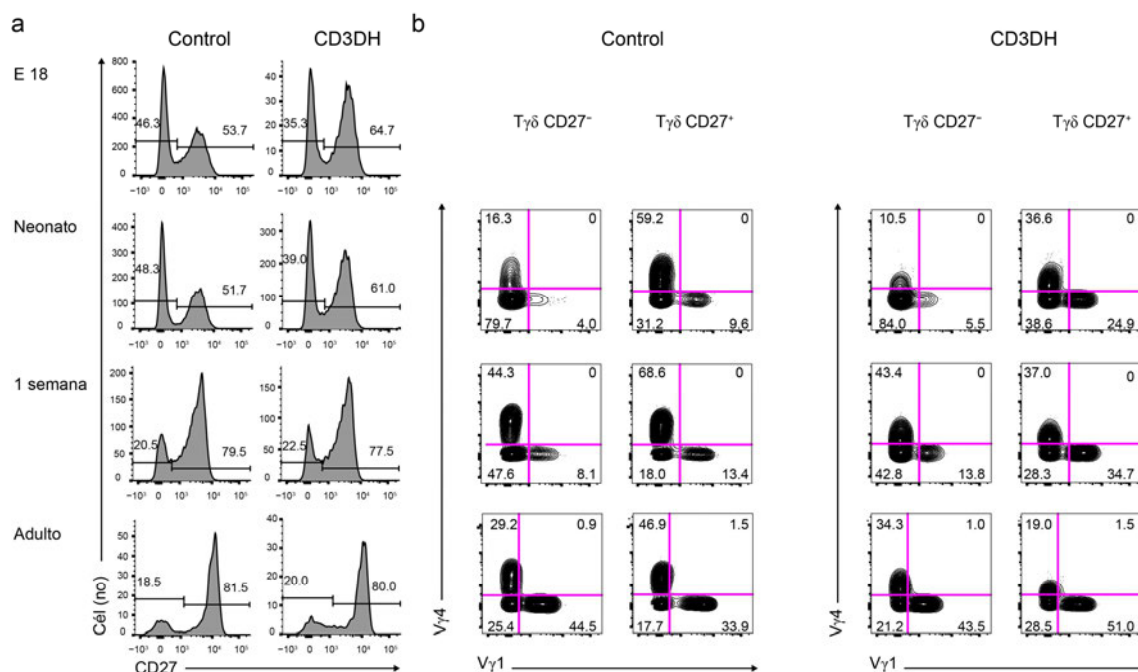


Figura R10. Desarrollo tímico de las células Tγδ CD27⁺ y Tγδ CD27⁻ y su uso específico de Vγ. (a) Análisis de la expresión de CD27 en la superficie de timocitos Tγδ (seleccionados como CD3⁺ TCRδ⁺) en diversas etapas del desarrollo de ratones control o CD3DH (n ≥ 10 por grupo). Los números sobre las líneas indican el % de células en la región marcada. (b) Análisis de la expresión extracelular de Vγ4 y Vγ1 en timocitos CD3⁺ TCRδ⁺ CD27⁻ o en CD3⁺ TCRδ⁺ CD27⁺ de ratones control o CD3DH (n ≥ 5 por grupo) en diferentes etapas de desarrollo (a).

2.1.1. Análisis de timocitos IFN-γ⁺ e IL-17⁺ y su repertorio Vγ

Tras el análisis extracelular, se realizó el análisis funcional de las poblaciones efectoras Tγδ en el ratón CD3DH. Las poblaciones se segregaron en Tγδ CD27⁺ y Tγδ CD27⁻. En el estado embrionario tardío (E18) se comprobó que los timocitos Tγδ IFNγ⁺ y Tγδ IL-17⁺ se encontraban disminuidos en los ratones CD3DH (Fig. R11a, b y c) comparado con los ratones control. Sin embargo mientras la deficiencia de IFN-γ se mantenía durante toda la ontogenia y estado adulto en estos ratones, la producción de IL-17 se normalizaba entre una y seis después del nacimiento comparado con los ratones control (Fig. R11a, b y c). Este hecho coincide con un cambio en el uso de Vγ por parte de las células Tγδ productoras de IL-17 durante el desarrollo (Fig. I6). La mayoría (aunque no el 100%) de estas células durante el estado embrionario tardío y neonato son Vγ1⁻/Vγ4⁻, que fueron validadas en su mayoría como Vγ6⁺⁴⁰, además, se ha descrito que estas células son generadas única y exclusivamente durante esta ventana temporal⁷⁶. Por otro lado, a partir de la primera semana las células Tγδ IL-17⁺ son en su mayoría Vγ4⁺. Así, se comprobó que en el timo embrionario de los ratones CD3DH, solo la población Vγ6⁺ se encontraba afectada, de todas las células Tγδ productoras de IL-17 (Fig. R11d). Como demuestra la acumulación de células Vγ4⁺ IL-17⁺ en neonato CD3DH y la disminución de linfocitos IL-17⁺ Vγ6⁺ en la misma situación (Fig. R11e). Lo que sugiere que las distintas ondas durante el desarrollo de los linfocitos Tγδ efectores (muy relacionadas con el uso de los diferentes Vγ's) presentan requerimientos diferenciales en cuanto a la intensidad de la señal a través del TCR.

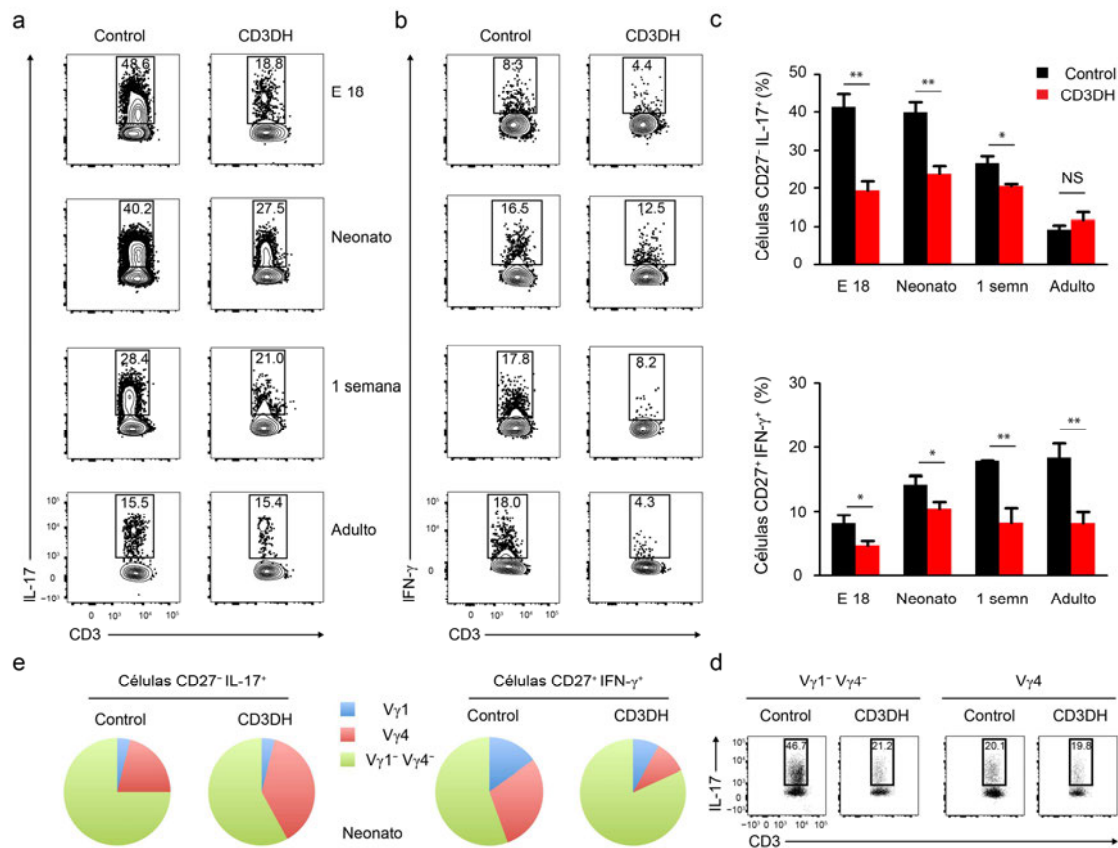


Figura R11. Análisis funcional de timocitos T $\gamma\delta$ CD27⁺ y T $\gamma\delta$ CD27⁻. (a) Análisis de la expresión intracelular de IL-17 en timocitos CD3⁺ TCR δ ⁺ CD27⁻ o (b) IFN- γ en CD3⁺ TCR δ ⁺ CD27⁺ de ratones control o CD3DH ($n \geq 5$ por grupo) en diferentes etapas de desarrollo como en (Fig. R10a) después de la estimulación con PMA e ionomicina. (c) Frecuencias de células T $\gamma\delta$ CD27⁻ IL-17⁺ (panel superior) y CD27⁺ IFN- γ ⁺ (panel inferior) en ratones control y CD3DH como se ilustra en (a) y (b), respectivamente. (d) Expresión intracelular de IL-17 en timocitos E18 CD3⁺ TCR δ ⁺ CD27⁻ de ratones control o CD3DH tras la estimulación con PMA e ionomicina. (e) Uso de elementos Vy en las células T $\gamma\delta$ CD27⁻ IL-17⁺ (panel izquierdo) y T $\gamma\delta$ CD27⁺ IFN- γ ⁺ (panel derecho). Los números dentro del área seleccionada indican el % de células en la región marcada. Los datos son representativos de dos a cuatro experimentos por cada etapa de desarrollo en (a) y (b). Los datos mostrados en (c) representan la media \pm SD. NS, no significativo; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ (prueba t de Student).

2.2. ANÁLISIS *IN VITRO*

Una vez analizados los efectos de la reducción de la señalización vía TCR $\gamma\delta$ en los ratones CD3DH a nivel de los linajes pro-inflamatorios, se evaluó si podría existir una re-circularización hacia el timo de alguna subpoblación específica timocitos T $\gamma\delta$ IFN- γ ⁺ o T $\gamma\delta$ IL-17⁺ con alguna consecuencia sobre los efectos que se obtuvieron en ratones *in vivo*. Por lo tanto, se intentaron reproducir los resultados anteriormente expuestos en un sistema *in vitro* como el de OP9-DL1.

2.2.1. Sistema OP9-DL1

Los datos obtenidos indican que los progenitores DN CD3DH, cuando son co-cultivados *in vitro* con células OP9-DL1 para su diferenciación, recapitulan el proceso de diferenciación que sufren en el timo: una menor expresión del TCR $\gamma\delta$ (Fig. R12a), así como una menor capacidad de producir IFN- γ en timo adulto sobre todo cuando se añade un coctel de citoquinas en el cultivo con la característica de favorecer la diferenciación de linaje IFN- γ como son IL-2 e IL-15 (Fig.

R12b). Por lo tanto, se descarta que el defecto en el desarrollo de los timocitos $T\gamma\delta$ CD3DH esté influenciado por alguna población que pudiera recircular hacia el timo y afectar al fenotipo observado *in vivo*. También se comprobó que el desarrollo tímico de las células $T\alpha\beta$ se mantenía como en los controles, pues no se aprecian defectos destacables ni a nivel de expresión del $TCR\alpha\beta$ ni en cuanto al número total de linfocitos $T\alpha\beta$, reproduciendo exactamente lo observado *in vivo*.

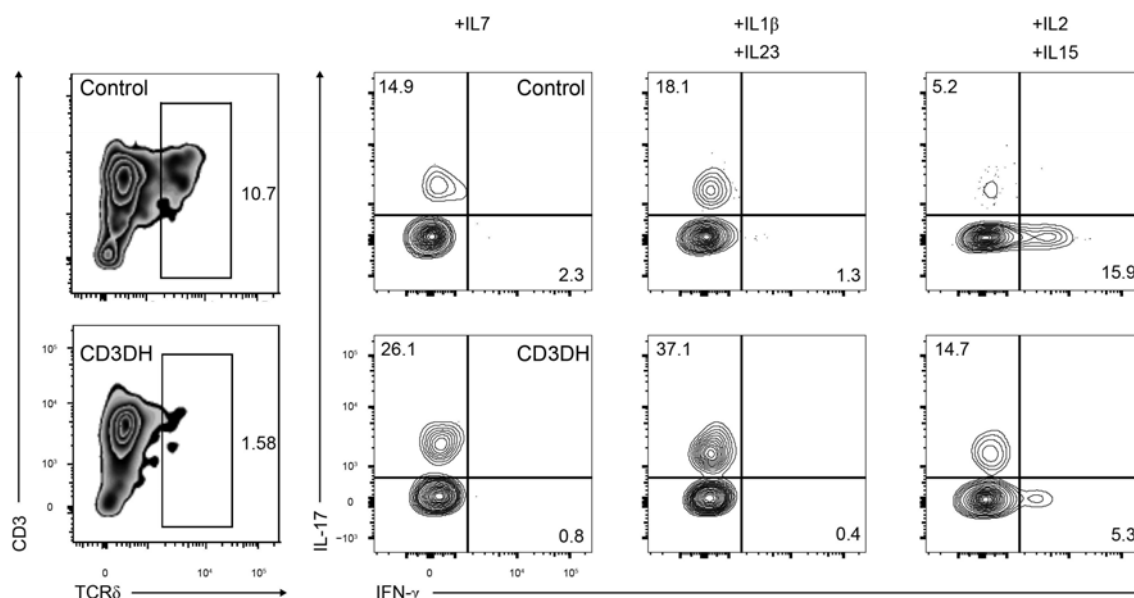


Figura R12. Reducción selectiva de la expresión del $TCR\gamma\delta$ y del número de linfocitos $T\gamma\delta$ y análisis funcional de timocitos $T\gamma\delta$ efectores en co-cultivo con OP9-DL1. (a) Análisis por citometría de flujo extracelular de CD3ε vs TCRδ en timocitos DN2 y DN3 de ratones control o dobles heterocigotos (CD3DH) tras 14 días en co-cultivo con células OP9-DL1. Los números al lado de la región marcada indican el porcentaje de células sobre el total de linfocitos. (b) Análisis por citometría de flujo intracelular de la producción de IFN-γ e IL-17 en timocitos DN2 y DN3 de ratones control o dobles heterocigotos (CD3DH) tras 14 días en co-cultivo con células OP9-DL1 y distintos cocteles de citoquinas tales como los indicados (IL-7, IL-1β+IL-23 o IL-2+IL-15). Los números dentro del área seleccionada indican el % de células en la región marcada. Los datos son representativos de al menos cuatro experimentos.

3. IMPRONTA TRANSCRIPCIONAL DE LOS TIMOCITOS T γ δ EN RATONES CD3DH

Debido a que la programación del desarrollo de las células T γ δ se establece a nivel transcripcional^{48, 54, 118}, se realizó un análisis de todo el transcriptoma en timocitos T γ δ totales aislados de ratones control o CD3DH en estado embrionario tardío (E18) o adultos (6 semanas de edad). Para ello estudiamos los cambios transcripcionales asociados con la reducción de la intensidad de la señal en la transición entre los estados embrionario y adulto en cada caso. En este punto es importante clarificar que esta evolución en el desarrollo se ve acompañada por una reducción drástica de los timocitos T γ δ capaces de producir IL-17 y una acumulación destacable de sus homólogos productores de IFN- γ (Fig. R13a).

3.1. EXPRESIÓN GÉNICA DURANTE LA ONTOGENIA

Los ARNm que aumentan la expresión entre el estadio embrionario y adulto en ratones control y que se ven generalmente alterados durante la ontogenia de ratones CD3DH, son aquellos que se relacionan directamente con la producción de IFN- γ (como son *Nr4a3*, *Nr4a2* y *Bcl2a1*, genes dependientes de CD27/LT β R y algunos factores de transcripción como *Egr2*, *Egr3* y *Id3*, descritos como supresores de la ruta de diferenciación IL-17⁶¹ y dependientes de una intensidad fuerte de la señal a través del TCR⁶⁵). Además, también se observó una alteración durante el desarrollo de CD3DH en otros genes relacionados con la producción de IFN- γ como el factor de transcripción *I κ B ζ* (codificado por *Nfkbiz*)¹¹⁹, los receptores GTR (codificados por *Tnfrsf18*), *Gp49a* y *Gp49b* (codificados por *Lilrb4*). Por otra parte los timocitos T γ δ se comportan de manera idéntica en relación a la regulación negativa de la expresión de los genes clave de la vía IL-17 hacia la edad adulta (enriquecidos en timocitos fetales) (Fig. R13a). Para analizar estos defectos de manera específica en los diferentes elementos V γ se aislaron distintos tipos de células T γ δ en función de su V γ característica y se analizaron distintas improntas transcripcionales particulares de cada una de las V γ . De manera consistente con la reducción de células V γ 6⁺ IL-17⁺, la impronta típica IL-17 *Sox4* y *Sox13*^{54, 73} se encontraban muy reducida en timocitos V γ 6⁺ pero no en V γ 4⁺ en embriones CD3DH comparado con control. Por el contrario la impronta típica V γ 4: *Bcl11* y *Blk* no se encontraban disminuidas, sino, más bien aumentadas en los subgrupos de los timocitos CD3DH, en comparación con los controles (Fig. R13b). De esta manera, estos datos vuelven a poner de manifiesto los distintos requerimientos en cuanto a intensidad de la señal de los linfocitos T γ δ productores de IL-17 (V γ 4⁺ y V γ 6⁺) y que se encuentra alterados selectivamente aquellos que son más dependientes de una intensidad fuerte de señal en los ratones CD3DH (Fig. R13).

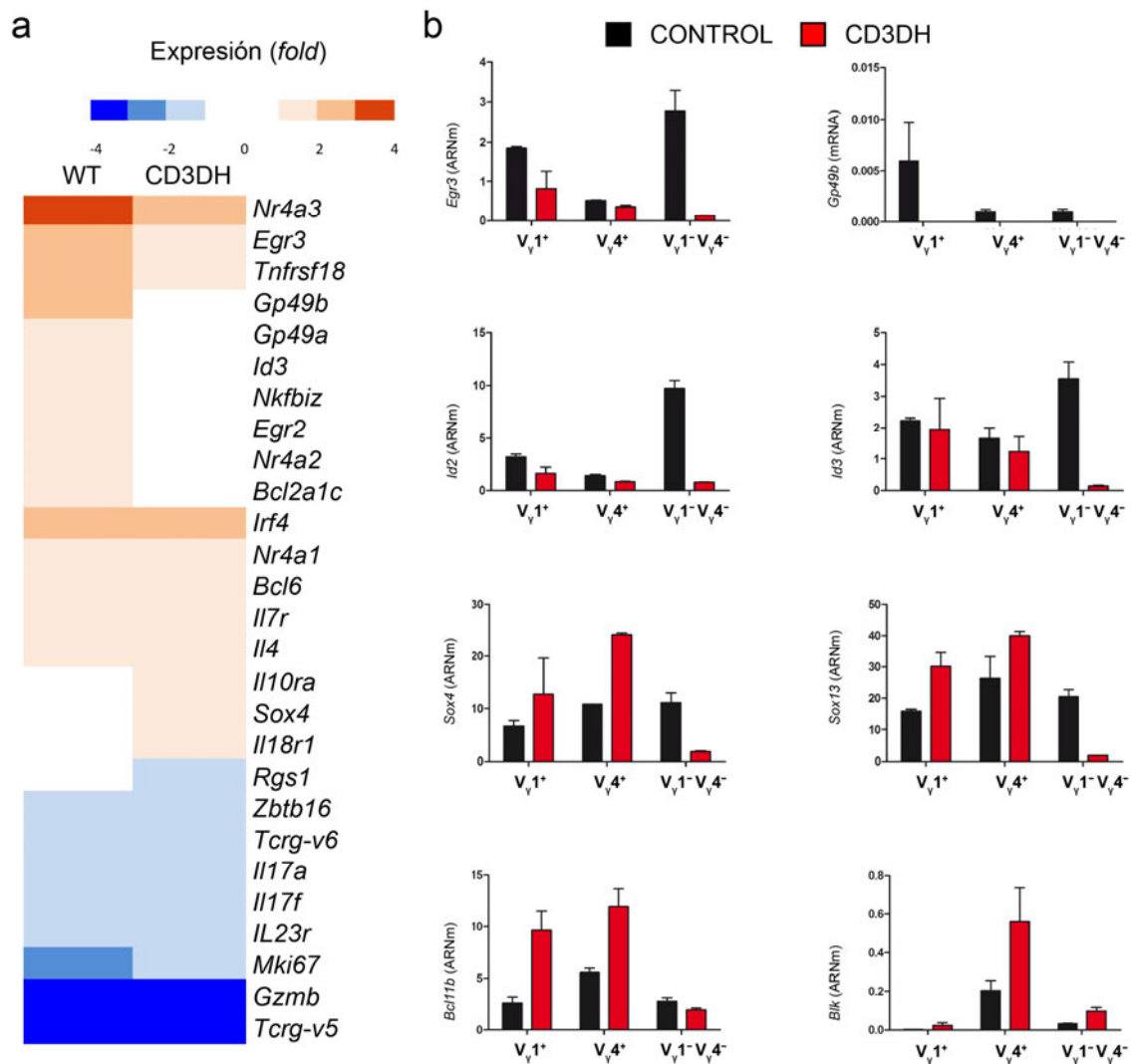


Figura R13. Impronta transcripcional durante la ontogenia relacionada con la intensidad de la señal de TCR en timocitos T $\gamma\delta$. (a) Mapa de color resultado de los *microarrays* de genes expresados diferencialmente durante la ontogenia (de embriones E18 a adultos) en timocitos CD3⁺ TCR δ ⁺ de tipo control o CD3DH. (b) Impronta transcripcional de subconjuntos de timocitos T $\gamma\delta$ basados en la diferenciación por distintos elementos V γ . Expresión relativa de *Egr3*, *Id2*, *Id3* y *Gp49b*, *Sox4*, *Sox13*, *Bcl11b* y *Blk*, en unidades arbitrarias normalizado para la expresión de *Hprt*. En las ordenadas timocitos V γ 1⁺, V γ 4⁺ o V γ 1⁻/V γ 4⁻ de embriones E18 de ratones control o CD3DH. Los datos mostrados en (b) representan la media \pm SD.

3.2. VALIDACIÓN DE GENES CANDIDATOS TRAS LA ESTIMULACIÓN VÍA TCR

Para complementar estos estudios de pérdida de función con un enfoque opuesto (ganancia de función mediada por el TCR), se estimularon timocitos T $\gamma\delta$ totales de ratones adultos control o CD3DH con cantidades saturantes de mAb anti-CD3 durante 16 horas (Fig. R14). Se observó una regulación positiva de la expresión *Egr2* y *Egr3* en timocitos T $\gamma\delta$ control, en consonancia con su asociación con señales fuertes del TCR. Es importante destacar que, el mismo fenómeno se observó también en cultivos de células T $\gamma\delta$ CD3DH, lo que sugiere que el aumento de la señalización de TCR (en virtud del entrecruzamiento todos los complejos disponibles en la superficie celular) puede rescatar la alteración de la transcripción de los timocitos T $\gamma\delta$ CD3DH. Por otro lado, la estimulación TCR exógeno era capaz de regular negativamente factores IL-17 tipo en cultivos control y CD3DH: *Sox4*, importante regulador ya descrito de la transcripción del

programa de IL-17 en timocitos $T\gamma\delta^{73}$ e IL23R y IL1R1, receptores para las principales citoquinas que promueven la producción de IL-17 por células $T\gamma\delta^{38, 48, 108}$. Estos experimentos de ganancia de función demuestran, a nivel transcripcional, que señales fuertes a través del TCR favorecen la producción de IFN- γ a expensas de IL-17 por timocitos adultos $T\gamma\delta$.

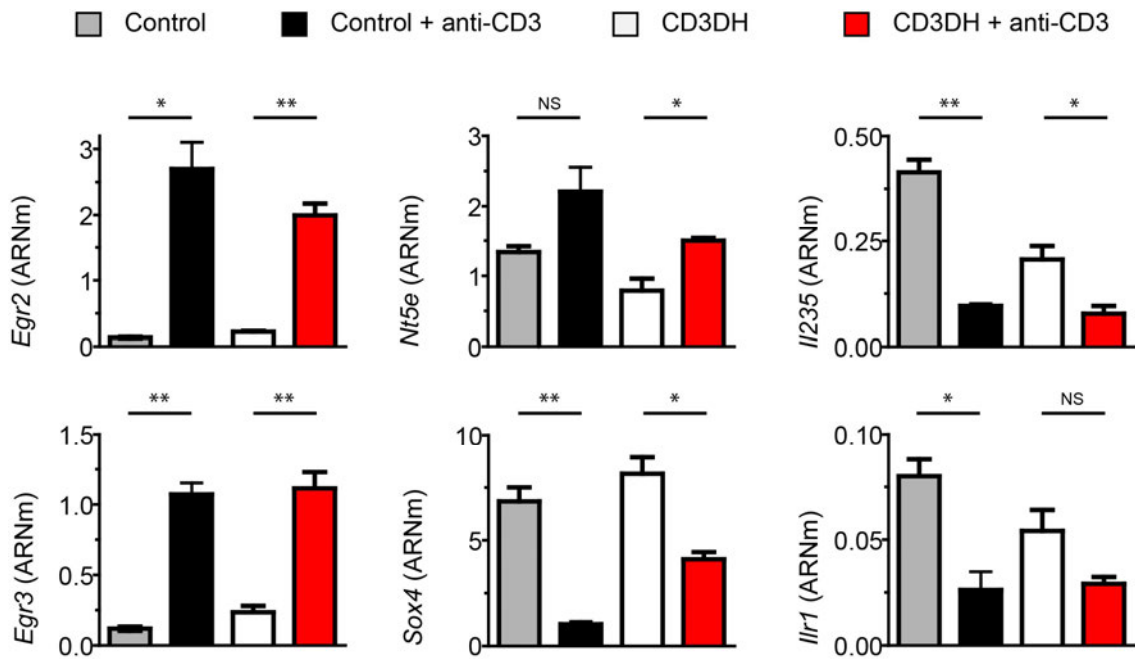


Figura R14. Ganancia de función mediada por el TCR en timocitos $T\gamma\delta$ adultos. Análisis de qPCR a tiempo real de *Egr2*, *Egr3*, *Nt5e* (que codifica CD73), *Sox4*, *Il23r* y *Ilr1* (en unidades arbitrarias normalizado para la expresión de *Hprt*). En el eje de ordenadas timocitos $CD3^+ TCR\delta^+$ procedentes de ratones control y CD3DH antes y después 16h de la estimulación con mAb anti-CD3 (10 μ g/ml). Los datos mostrados representan la media \pm SD. NS, no significativo; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ (prueba t de Student).

4. AUSENCIA DE TIMOCITOS $T\gamma\delta$ $IFN\gamma^+$ $CD122^+$ $NK1.1^+$ EN RATONES CD3DH

Dado que la deficiencia de $IFN-\gamma$ se mantiene durante toda la vida en el timo del ratón CD3DH, se planteó si este defecto se debía a un problema específico de cada célula (menor capacidad para producir $IFN-\gamma$ por cada célula $T\gamma\delta$) o a la ausencia de una población específica con capacidad para producir $IFN-\gamma$. Para ello, se analizó en profundidad el compartimento $CD27^+$ de las células $T\gamma\delta$. Se usaron algunos marcadores adicionales anteriormente descritos y asociados a la producción de $IFN-\gamma$ como pueden ser $CD45RB^{14}$, $CD122^{37}$ y $NK1.1^{50, 113}$.

4.1. AUSENCIA DE LA SUBPOBLACIÓN $T\gamma\delta$ $CD27^+$ $CD122^+$ $NK1.1^+$ *IN VIVO*

Evaluando estos marcadores asociados con la producción de $IFN-\gamma$, se observó como en el timo de ratones CD3DH comparado con los ratones control, la población $T\gamma\delta$ $CD27^+$ doble positiva para $CD122$ y $NK1.1$ se encontraba reducida drásticamente (Fig. R15a). Este dato es significativo para el número total de células y para el porcentaje de las mismas (Fig. R15b). También, se observó que la población $CD122^+$ $NK1.1^-$ se encuentra parcialmente disminuida (Fig. R15a), postulándose como un probable precursor de la población $CD122^+$ $NK1.1^+$. En la misma línea, la población doble negativa se encuentra ligeramente aumentada en los ratones CD3DH (Fig. R13a), lo que podría sugerir una posible “vía de diferenciación escalonada” de las células $T\gamma\delta$ $CD27^+$: las células $CD122^-$ $NK1.1^-$ (Estado 0) que reciben señal media se dirigen hacia $CD122^+$ $NK1.1^-$ y de estas últimas las que reciben una señal más fuerte se convierten en $CD122^+$ $NK1.1^+$. Aunque también podría darse una “vía de diferenciación dividida”: Estado 0 ($CD122^-$ $NK1.1^-$) son células que reciben señal débil y de aquí si reciben señal media se dirigen a Estado $CD122^+$ $NK1.1^-$ o si reciben señal fuerte se dirigen a Estado $CD122^+$ $NK1.1^+$. De cualquier manera, estos datos ponen de manifiesto que la reducción en la producción de $IFN-\gamma$ se debe principalmente a la reducción específica de una subpoblación de células $T\gamma\delta$ que tiene la capacidad de producir $IFN-\gamma$.

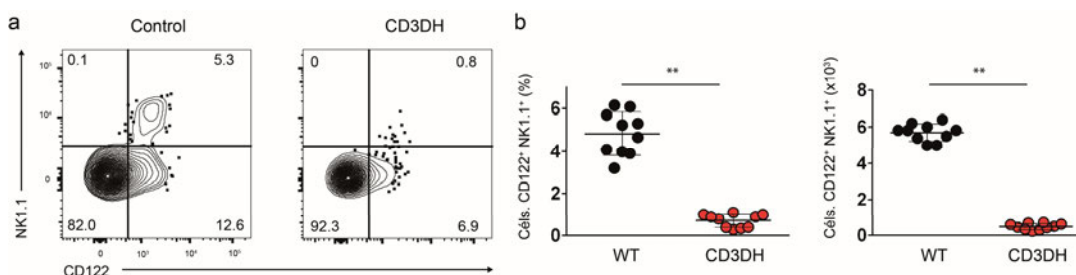


Figura R15. Ausencia de la población $T\gamma\delta$ $CD27^+$ $CD122^+$ $NK1.1^+$ en timo en ratones CD3DH. (a) Análisis por citometría de flujo de la expresión de $CD122$ vs $NK1.1$ en timocitos adultos $CD3^+$ $TCR\delta^+$ $CD27^+$ de ratones control o CD3DH ($n = 10$ ratones por grupo). (b) Frecuencias (izquierda) y número total (derecha) de timocitos $CD3^+$ $TCR\delta^+$ $CD27^+$ $CD122^+$ $NK1.1^+$. Cada punto en (b) representa un ratón individual. Los datos mostrados representan la media \pm SD. ** $P < 0,01$ (prueba t de Student). Los números dentro del área seleccionada indican el % de células en la región marcada.

4.2. CARACTERIZACIÓN DE LA SUBPOBLACIÓN $T\gamma\delta$ $CD27^+$ $CD122^+$ $NK1.1^+$

Poco se sabe de esta subpoblación tímica de linfocitos $T\gamma\delta$ ausente en los ratones CD3DH; para conocerla mejor y analizar las diferencias existentes entre las subpoblaciones $CD27^+$, se decidió realizar un estudio comparativo en ratones control entre las poblaciones $CD122^+$ $NK1.1^+$ (ausente en CD3DH) y $CD122^-$ $NK1.1^-$ (presente en CD3DH y postulada como posible precursora de las demás subpoblaciones $T\gamma\delta$ $CD27^+$). Así, se evaluó la expresión de algunos marcadores de

superficie relacionados con la selección agonista y la experiencia antigénica, en todos los casos analizados se observó una elevada expresión de dichos marcadores en la población $CD122^+ NK1.1^+$ mientras que eran negativos en la población $CD122^- NK1.1^-$ ($CD73$: marcador de señalización vía TCR durante el desarrollo tímico. $CD44$: marcadores de maduración¹⁴. $CD45RB$: indicador de señalización vía TCR⁶¹). Demostrando la elevada dependencia de intensidad fuerte de señal a través del TCR de la población $T\gamma\delta CD27^+ CD122^+ NK1.1^+$, además, esta población expresa los niveles más altos de $IFN-\gamma$ dentro de las células $CD27^+$ (Fig. R16a). Por último, el repertorio de las $V\gamma$ utilizados varía desde $CD122^- NK1.1^-$ hacia $CD122^+ NK1.1^+$ lo que sugiere ciertamente una selección vía TCR (Fig. R16b). Todos estos datos, sugieren un defecto en la diferenciación de células $T\gamma\delta$ productoras de $IFN-\gamma$ en los ratones $CD3DH$ debido a la alteración de la intensidad de la señal recibida a través del TCR.

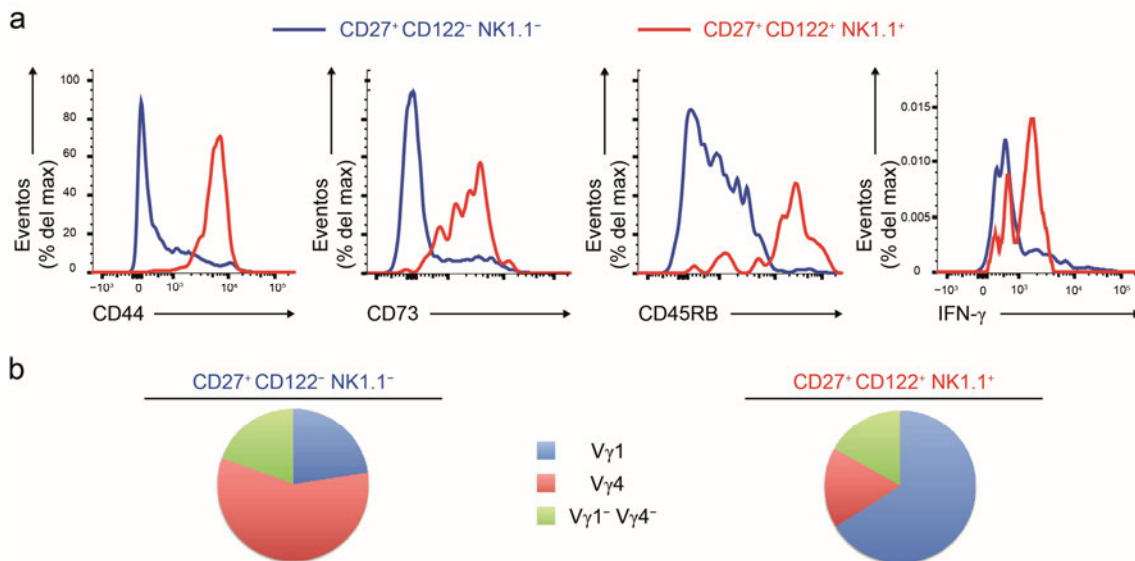


Figura R16. Caracterización de la población $T\gamma\delta CD27^+ CD122^+ NK1.1^+$ control. (a) Análisis por citometría de flujo de la expresión en la superficie de la célula de los marcadores $CD44$, $CD73$, $CD45RB$ y la producción de $IFN-\gamma$ intracelular por subconjuntos de timocitos $CD3^+ TCR\delta^+ CD27^+ CD122^+ NK1.1^+$ (rojo) o $CD3^+ TCR\delta^+ CD27^+ CD122^- NK1.1^-$ (azul) en ratones control adultos ($n = 5$ por grupo). (b) Uso de elementos $V\gamma$ en las células $T\gamma\delta CD27^+ CD122^- NK1.1^-$ (panel izquierdo) y $T\gamma\delta CD27^+ CD122^+ NK1.1^+$ (panel derecho).

4.3. RESTABLECIMIENTO DE LA SUBPOBLACIÓN $T\gamma\delta CD27^+ CD122^+ NK1.1^+$ EN RATONES $CD3DH$

Los resultados anteriores demuestran que la población afectada en los ratones $CD3DH$ ($T\gamma\delta CD27^+ CD122^+ NK1.1^+$), depende directamente para su generación de una intensidad fuerte de señal a través del $TCR\gamma\delta$. Así, se quiso restablecer su generación intentando mimetizar una señal fuerte vía TCR *in vivo*; para ello se administró de manera intraperitoneal anticuerpo (clon 17A2) dirigido contra el complejo TCR, con la intención de entrecruzar las unidades del complejo y aumentar así la intensidad de la señal a través del mismo. Este tratamiento recupera la población $T\gamma\delta CD27^+ CD122^+ NK1.1^+$ en ratones $CD3DH$ hasta los mismos niveles que los ratones control (Fig. R17). Además las proporciones de esta subpoblación en los ratones control y $CD3DH$ aumentan considerablemente si se compara con ratones sin tratamiento. (Figs. R15a R15b), lo que sugiere que la administración exógena de una intensidad fuerte de la señal a través del TCR favorece el desarrollo de esta población. Por lo tanto, estos datos demuestran que la población $T\gamma\delta CD27^+ CD122^+ NK1.1^+$ depende críticamente de una señal fuerte a través del TCR y su ausencia en ratones $CD3DH$ se relaciona con una disminución de la señalización a través del mismo, ya que se puede restablecer con la administración de un anticuerpo de manera intraperitoneal en los ratones $CD3DH$ y aumentada en controles.

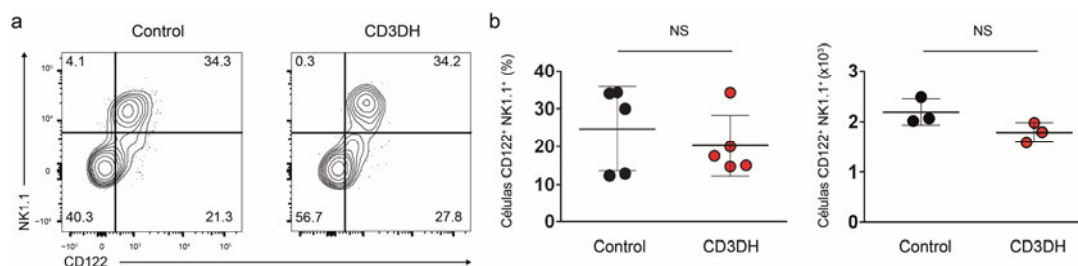


Figura R17. Restablecimiento de la población Tγδ CD27⁺ CD122⁺ NK1.1⁺. (a) Análisis por citometría de flujo extracelular de la expresión de CD122 vs NK1.1 en timocitos de adultos CD3⁺ TCRδ⁺ CD27⁺ de ratones control o CD3DH (n = 10 ratones por grupo), 5 días después de inyección intraperitoneal con mAb anti-CD3 (clon 17A2) (n = 3 por grupo). (b) Frecuencias (izquierda) y número total (derecha) de timocitos CD3⁺ TCRδ⁺ CD27⁺ CD122⁺ NK1.1⁺. Cada punto en (b) representa un ratón individual. Los datos mostrados representan la media ± SD. NS, no significativo (prueba t de Student). Los números en los cuadrantes de los análisis por citometría de flujo indican porcentajes de células en cada uno.

4.4. QUIMERAS DE MÉDULA ÓSEA

Aprovechando el enfoque de reconstitución competitiva descrito en el capítulo de Resultados 1.4., donde las células Tγδ CD3DH se desarrollan en presencia de células Tγδ normales y en un nicho completo, se evaluó la generación de células Tγδ CD27⁺ CD122⁺ NK1.1⁺ en dos escenarios diferentes. Ratones RAG2KO y TCRδKO irradiados a dosis letales se reconstituyeron con precursores hematopoyéticos mixtos a diferentes proporciones (1:1 o 1:9) de origen control (WT.Thy-1.1) y CD3DH (CD3DH.Thy-1.2). Se analizó el timo de los ratones quiméricos a las 6 semanas para la población Tγδ CD27⁺ CD122⁺ NK1.1⁺. Estos ratones eran capaces de generar la población de interés (Fig. R18a), pero al estudiar su origen gracias a los marcadores Thy-1.1 y Thy-1.2, se comprobó como la mayoría de la población Tγδ CD27⁺ CD122⁺ NK1.1⁺ expresa únicamente Thy-1.1. Lo que demuestra que en los ratones quiméricos estudiados, esta población tiene como origen los precursores hematopoyéticos control y no los precursores CD3DH (la población Tγδ CD27⁺ CD122⁺ NK1.1⁺ que expresa Thy-1.2 es prácticamente nula) (Fig. R18b).

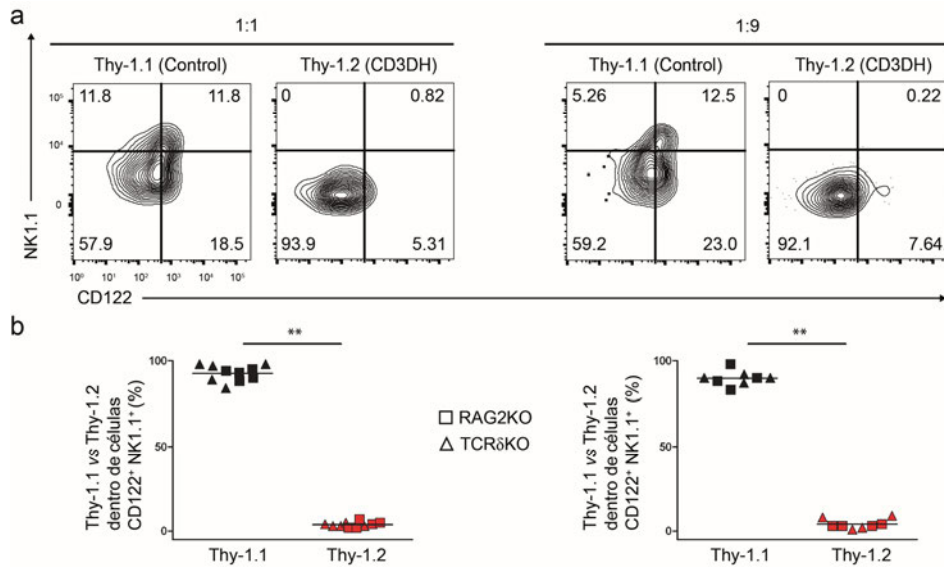


Figura R18. Población $\gamma\delta$ CD27⁺ CD122⁺ NK1.1⁺ tímica tras reconstitución competitiva con precursores hematopoyéticos. (a) Análisis por citometría de flujo de la expresión de CD122 vs NK1.1 en timocitos de ratones adultos CD3⁺ TCRδ⁺ CD27⁺ en fracciones Thy-1.1⁺ (derivados de control) o Thy-1.2⁺ (derivados de CD3DH). (b) Análisis por citometría de flujo de timocitos CD3⁺ TCRδ⁺ CD27⁺ CD122⁺ NK1.1⁺ en ratones quiméricos 1:1 (izquierda) o 1:9 (derecha) para su origen Thy-1.1⁺ (derivados de WT) o Thy-1.2⁺ (derivados de CD3DH). Cada símbolo indica un ratón RAG2KO o TCRδKO. Los datos mostrados representan la media ± SD. ** P < 0,01 (prueba t de Student). Los números en los cuadrantes de los análisis por citometría de flujo indican porcentajes de células en cada uno.

5. DEFECTO EN LAS CÉLULAS $T\gamma\delta$ $IFN-\gamma^+$ PERIFÉRICAS EN RATONES CD3DH

El estudio del ratón CD3DH presentado hasta esta aquí, engloba el desarrollo tímico de las células $T\gamma\delta$ efectoras. Pero también se analizó si este defecto podría tener alguna consecuencia o reflejo en los diferentes tipos $T\gamma\delta$ efectores en periferia y si existe algún mecanismo compensatorio que recupere el fenotipo observado, más allá del timo.

5.1. AUSENCIA DE LA POBLACIÓN $T\gamma\delta$ $CD27^+$ $CD122^+$ $NK1.1^+$ *IN VIVO*

Por lo tanto, se estudiaron en periferia los mismos marcadores que antes se mostraron para estudiar los diferentes subgrupos celulares $T\gamma\delta$ en timo, así como la capacidad de estos para producir citoquinas tras estimulación. La deficiencia de producción de $IFN-\gamma$ era igual que la observada en el timo durante toda la ontogenia y estado adulto, mientras que la producción de IL-17 se encontraba normalizada en periferia (bazo en este caso) (Fig. R19a y R19b), consistente con los datos observados en timo adulto y con el hecho de que en el ratón CD3DH las células $V\gamma6^+$ IL-17⁺ (que solo se producen en estado embrionario) se encuentran afectadas pero no las $V\gamma4^+$ IL-17⁺ (Fig. R11a y R11b).

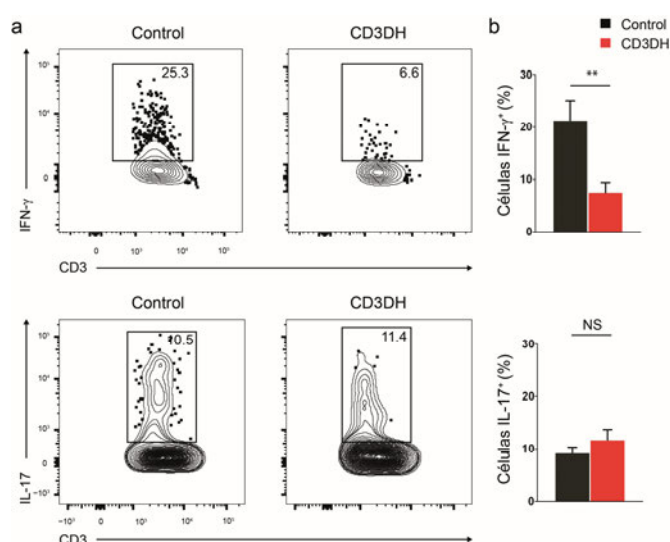


Figura R19. Deficiencia de producción de $IFN-\gamma$ periférica en células $T\gamma\delta$ en ratones CD3DH. (a, b) Análisis por citometría de flujo intracelular (a) y cuantificación (b) de la expresión de $IFN-\gamma$ en $CD3^+ TCR\delta^+ CD27^+$ (parte superior) e IL-17 en $CD3^+ TCR\delta^+ CD27^-$ (parte inferior) en esplenocitos de ratones adultos estimulados con PMA e ionomicina. $n = 5$ ratones por grupo (a, b). Los datos de a y b son representativos de tres experimentos independientes. ** $P < 0,01$ (prueba t de Student); Los datos mostrados representan la media \pm SD. Los números en los cuadrantes de los análisis por citometría de flujo indican porcentajes de células en cada uno.

También, se comprobó cómo la población $T\gamma\delta$ $CD27^+$ doble positiva para CD122 y NK1.1 se encuentra reducida en órganos periféricos de ratones CD3DH comparando con ratones control (Fig. R20a). Cabe destacar que se observa una acumulación mayor de estas células en órganos periféricos que en el timo. Este dato es significativo tanto para el número total de células como para el porcentaje de las mismas (Fig. R20b). También, se observó cómo la población $CD122^+$ $NK1.1^-$ se encuentra parcialmente disminuida y la población doble negativa se encuentra ligeramente aumentada en los ratones CD3DH (Fig. R20a), lo que revela un fenotipo similar entre timo y periferia en los ratones CD3DH. Es importante destacar que estos defectos

periféricos fueron observados en bazo, ganglios linfáticos y sangre. Igualmente en todos los órganos periféricos estudiados se observaba una reducción selectiva de la expresión del TCR $\gamma\delta$ consistente con los análisis de timo.

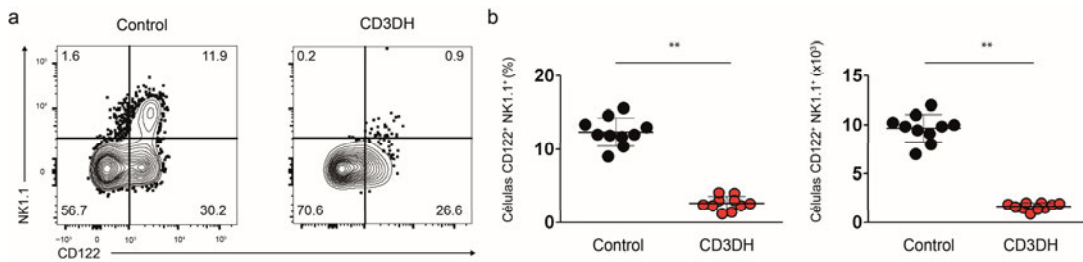


Figura R20. Ausencia de la población T $\gamma\delta$ CD27⁺ CD122⁺ NK1.1⁺ en periferia en ratones CD3DH (bazo). (a) Análisis por citometría de flujo de la expresión de CD122 vs NK1.1 en esplenocitos adultos CD3⁺ TCR δ ⁺ CD27⁺ de ratones control o CD3DH (n = 10 ratones por grupo). (b) Frecuencias (izquierda) y número total (derecha) de esplenocitos CD3⁺ TCR δ ⁺ CD27⁺ CD122⁺ NK1.1⁺. Cada punto en (b) representa un ratón individual. Los datos mostrados representan la media \pm SD. ** P < 0,01 (prueba t de Student). Los números en los cuadrantes de los análisis por citometría de flujo indican porcentajes de células en cada uno.

Por otro lado, también se comprobó que este fenotipo periférico de IFN- γ , afectaba únicamente a las células T $\gamma\delta$ ya que las células CD4 convencionales de estos ratones eran capaces de diferenciarse sin problemas a células Th1 en las condiciones adecuadas y producir IFN- γ a niveles similares que los ratones control (Fig. 21).

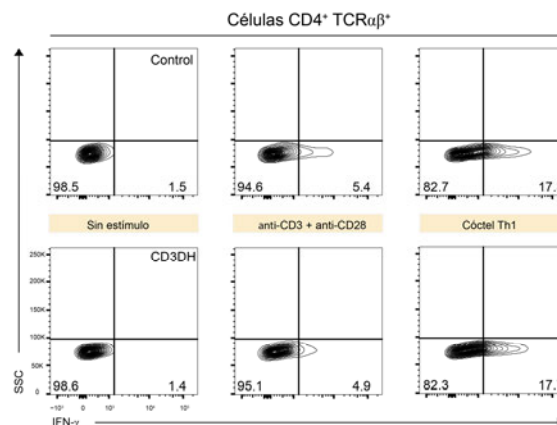


Figura R21. Capacidad de diferenciación a células Th1 de células CD4⁺ convencionales bajo las condiciones adecuadas. Células de bazo T $\alpha\beta$ CD4⁺ de ratones control o CD3DH se aislaron por citometría de flujo y se incubaron durante 4 días en la placa de fondo redondo mAb anti-CD3 y anti-CD28 (5 ng/ml cada uno). Cuando se indica (cóctel Th1), se añadieron las siguientes citoquinas y anticuerpos neutralizantes al medio de cultivo: IL-2 (10 ng/ml), IL-12 (50 ng/ml) y anti-IL-4 (11B11) (10 mg / ml). Los números en los cuadrantes de los análisis por citometría de flujo indican porcentajes de células en cada uno.

5.2. QUIMERAS DE MÉDULA OSEA

Aprovechando el enfoque de reconstitución competitiva, donde las células T $\gamma\delta$ CD3DH se desarrollan en presencia de células T $\gamma\delta$ totalmente normales y en un nicho completo, se evaluó la presencia de células T $\gamma\delta$ CD27⁺ CD122⁺ NK1.1⁺ en periferia en dos escenarios diferentes. Ratones RAG2KO y TCR δ KO irradiados se reconstituyeron con precursores hematopoyéticos mixtos a diferentes proporciones (1:1 o 1:9) de origen WT.Thy-1.1 y CD3DH.Thy-1.2. Los ratones quiméricos se analizaron a las 6 semanas para la población T $\gamma\delta$ CD27⁺ CD122⁺ NK1.1⁺ en periferia

(Fig. R22). Estos ratones eran capaces de generar esta población, pero al estudiar su origen gracias a los marcadores Thy-1.1 y Thy-1.2, se pudo comprobar como la mayoría de la población $T\gamma\delta$ $CD27^+$ $CD122^+$ $NK1.1^+$ expresa Thy-1.1. Esto demuestra inequívocamente que en periferia, esta población tiene como origen los precursores hematopoyéticos control (la población $T\gamma\delta$ $CD27^+$ $CD122^+$ $NK1.1^+$ que expresa Thy-1.2 es prácticamente nula).

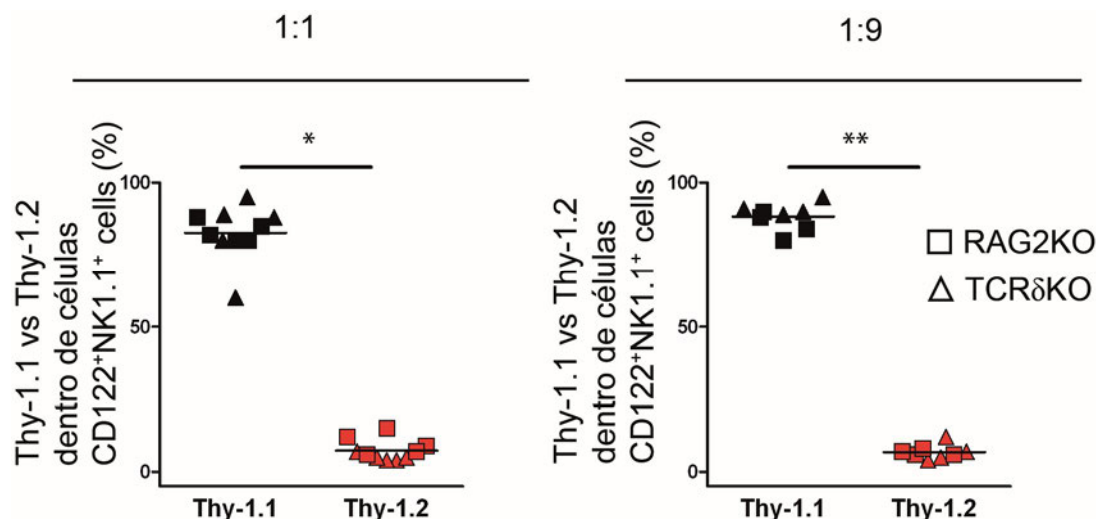


Figura R22. Población esplénica $T\gamma\delta$ $CD27^+$ $CD122^+$ $NK1.1^+$ tras reconstitución competitiva. Análisis por citometría de flujo de esplenocitos $CD3^+$ $TCR\delta^+$ $CD27^+$ $CD122^+$ $NK1.1^+$ en ratones adultos quiméricos 1:1 (izquierda) o 1:9 (derecha) para su origen Thy-1.1⁺ (derivados de control) o Thy-1.2⁺ (derivados de CD3DH). Cada símbolo indica un ratón RAG2KO o TCRδKO. Los datos mostrados representan la media ± SD. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ (prueba t de Student).

5.3. MODELO *IN VIVO*: RESISTENCIA A MALARIA CEREBRAL EXPERIMENTAL

Apoyándose en estos datos obtenidos en periferia, se pensó que los ratones adultos CD3DH serían un modelo ideal para evaluar la importancia fisiológica de las células $T\gamma\delta$ productoras de IFN- γ en un escenario de enfermedad dependiente de IFN- γ .

Para ello utilizamos un protocolo que es capaz de inducir malaria cerebral en ratones control, una patología dependiente de IFN- γ con una importante contribución de las células $T\gamma\delta$ en su fase hepática, tanto en ratones (Fig. R23a y nuestros datos no publicados) como en humanos³¹. La ECM se indujo usando esporozoitos de *Plasmodium berghei* ANKA, lo que conduce al establecimiento de la infección en fase hepática antes de extenderse a la fase sanguínea que es sintomática. La respuesta $T\gamma\delta$ se evaluó en la fase sanguínea el día 5 después de la infección en el bazo. Mientras que los ratones control presentaron una población abundante de células $T\gamma\delta$ IFN- γ^+ , esta se redujo notablemente en los animales CD3DH (Fig. R23b). Esto se asocia con una mayor parasitemia (porcentaje de glóbulos rojos infectados) en ratones CD3DH (Fig. 23c), lo que es consistente con las respuestas defectuosas de IFN- γ . En cuanto a la evolución de la enfermedad, los síntomas neurológicos aparecieron en los ratones control alrededor del día 6 después de la infección y se convirtió en mortal en todos los animales durante los días 7-10. Por el contrario, los ratones TCRδKO, así como algunos ratones CD3DH permanecieron sanos y sobrevivieron a la ventana letal de ECM (Fig. R23a). Por lo tanto, los procesos de desarrollo analizados tienen importantes consecuencias para el ratón, es decir, afecta a su susceptibilidad a síndromes inflamatorios como la malaria cerebral. También permite establecer que los ratones CD3DH (adultos) son un modelo nuevo y valioso para evaluar la importancia fisiopatológica de las células $T\gamma\delta$ pro-inflamatorias.

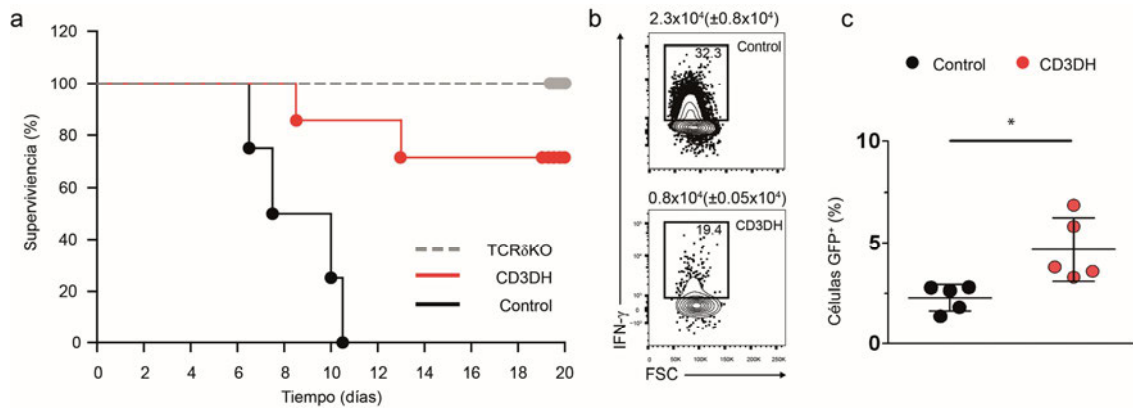
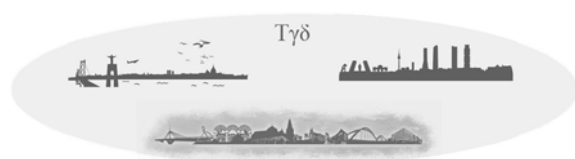


Figura R23: Evaluación del curso de malaria cerebral experimental. (a) Curvas de supervivencia de ratones infectados con esporozoitos de *P. berghei* ANKA ($n = 10$ ratones en dos experimentos independientes). (b) Cuantificación intracelular de la expresión de IFN- γ en linfocitos CD3 $^+$ TCR δ^+ CD27 $^+$ de ratones adultos estimulados con PMA e ionomicina. $n = 5$ ratones por grupo (c) Parasitemia como porcentaje de GFP $^+$ células de la sangre 5 días después de la infección con esporozoitos de *P. berghei* ANKA. Cada punto en (b) representa un ratón individual. Los datos mostrados representan la media \pm SD. * $P < 0,05$ (prueba t de Student).

DISCUSIÓN



1. VENTAJAS DEL MODELO CD3DH

El TCR ha sido considerado históricamente como un actor fundamental en el desarrollo de las células $T\alpha\beta$, e incluso en la decisión de linaje $T\alpha\beta$ vs $T\gamma\delta$, pero entender su rol en el desarrollo de las células $T\gamma\delta$ ha sido más complejo a lo largo de la historia^{45, 46, 47, 97, 120}, debido a la dificultad para identificar ligandos del $TCR\gamma\delta$ ^{9, 19} principalmente (como demuestra la escasez numérica de los ya conocidos⁹). Pocos trabajos han podido abordar este papel del TCR de una forma convincente, y los pocos que lo han hecho han utilizado una aproximación monoclonal (ratones que expresan un TCR transgénico), lo que impide el abordaje de esta pregunta para la gran mayoría de las células $T\gamma\delta$ ^{37, 61}. Por lo tanto, el papel que juega el TCR y sus señales en el desarrollo específico de los subtipos de células $T\gamma\delta$ pro-inflamatorias permanece aún bajo un constante e intenso debate^{23, 68}. Tratando de resolver esta controversia, se decidió realizar una aproximación diferente: intentamos manipular la señalización vía TCR *in vivo* mediante la interferencia genética de distintas cadenas que forman parte del TCR. El objetivo parecía simple: si se consigue modular la cantidad de receptor presente en la membrana, teóricamente se podría modular la cantidad de señal que recibe la célula a través del mismo. Para ello se generaron inicialmente ratones haploinsuficientes simples para las distintas cadenas de CD3, pues se planteó, que si reducíamos la disponibilidad de ciertas cadenas CD3 a la hora de conformar el receptor (sin eliminar las cadenas por completo, como sucedería en una situación de deficiencia total), este podría alterarse de alguna manera durante el proceso de ensamblaje, con consecuencias sobre su estabilidad. Como se observa en la Fig. R1, en ninguno de los casos estudiados de haploinsuficiencia simple se producen defectos drásticos en el compartimento celular T. De esta manera, a pesar de ser haploinsuficientes para algún componente del TCR, la cantidad de proteína disponible parece suficiente para poder conformar un receptor en el retículo endoplásmico, exportarlo hacia la superficie celular y que dé lugar a una señal adecuada para el desarrollo del repertorio T. En términos cuantitativos parece que en estas situaciones estaríamos reduciendo la señal a través del TCR en un porcentaje tan pequeño que no afecta a las células que dependen de una intensidad de señal fuerte, cómo las células $T\gamma\delta$ ^{45, 46}. Siguiendo esta idea, buscamos reducir un poco más esta señal tratando de observar algún efecto en el desarrollo de las células T. Así, se generó una línea de ratones con haploinsuficiencia combinada de *Cd3g* y *Cd3d* (CD3DH). En estos ratones se produce una reducción selectiva en la expresión del $TCR\gamma\delta$ en membrana y en la generación de células $T\gamma\delta$, pero no se produce defecto alguno en las células $T\alpha\beta$ (ni en la expresión del receptor ni en el número de células) (Fig. R2). La explicación de este hecho, podría estar basada en el planteamiento inicial que se realizó para generar estos ratones. Según el modelo de “intensidad de la señal” para la decisión de linaje $T\alpha\beta$ o $T\gamma\delta$, una señal fuerte a través del receptor de membrana dirige a las células T que la reciben hacia el linaje $T\gamma\delta$, mientras que si atenuamos esta señal, la misma célula podría dirigirse hacia el linaje $T\alpha\beta$ ^{45, 46}. Así, puede afirmarse que en nuestros ratones, por un mecanismo aún desconocido y que se discutirá en el capítulo siguiente, hemos conseguido reducir la intensidad de la señal en una proporción tal que tiene como consecuencia una reducción en el número de células $T\gamma\delta$ y el mantenimiento dentro de porcentajes normales de la cantidad de células $T\alpha\beta$. En los ratones CD3DH, la reducción de la intensidad de la señal viene originada directamente por una reducción de la expresión del receptor en superficie, y esto tendría su origen en la manipulación genética del ratón: menor disponibilidad de los componentes del TCR para conformar el complejo. Pero sin embargo, para validar nuestro modelo de reducción de señal vía $TCR\gamma\delta$, era necesario demostrar que una reducción en la expresión del receptor $TCR\gamma\delta$ implicaba una reducción en la capacidad de señalización de los linfocitos. Para ello se realizaron diferentes análisis de marcadores relacionados con selección “agonista” (la derivada presumiblemente de una interacción fuerte con ligando¹¹¹) y maduración en el timo^{92, 37} (Fig. R7); también de marcadores de activación temprana y tardía tras estimulación del TCR en células $T\gamma\delta$ periféricas (Fig. R8). Según estos resultados, se puede concluir que los ratones CD3DH

exhiben una reducción en la capacidad de señalización del TCR $\gamma\delta$ en timocitos y células periféricas. Por eso consideramos que estos ratones son un modelo único y útil para poder estudiar el impacto de la intensidad de la señal a través del receptor en el desarrollo tímico de los subtipos T $\gamma\delta$ pro-inflamatorios; un reto complicado hasta la fecha debido a las complicaciones metodológicas existentes en este campo. Una de las ventajas de este modelo comparado con modelos anteriores, radica en el hecho de que permite el análisis del repertorio policlonal de linfocitos T $\gamma\delta$, lo que puede ayudar a entender su desarrollo en el timo dada la relación existente entre el uso de ciertos genes TCR γ y su diferenciación funcional durante la ontogenia (Fig. I6).

2. POSIBLE MECANISMO

En este contexto, la haploinsuficiencia simple de *Cd3g* o *Cd3d* no tiene un impacto aparente ni en la expresión del TCR $\gamma\delta$ ni en el desarrollo de los linfocitos T $\gamma\delta$ (Fig. R1). Por otro lado, se cree que la cadena CD3 δ no forma parte del TCR $\gamma\delta$ de superficie en el ratón y se piensa que esta cadena es prescindible para el desarrollo y expresión del complejo⁹⁴. De este modo, resulta sorprendente que la haploinsuficiencia combinada de *Cd3g* y *Cd3d* afecte selectivamente a la expresión del TCR $\gamma\delta$ y al desarrollo T $\gamma\delta$ en el timo. Para entender este hallazgo, analizamos con detalle los datos bibliográficos relevantes del ratón CD3 δ KO⁹⁴ y comprobamos que existe una reducción en los niveles de expresión del TCR $\gamma\delta$ en los timocitos de estos ratones. Estos datos (que fueron reproducidos en nuestro laboratorio; Fig. R4) sugieren que la cadena CD3 δ tiene un impacto (de origen desconocido) sobre la expresión del complejo maduro TCR $\gamma\delta$ ¹¹² en superficie. Habría que añadir también que la reducción de la expresión del receptor en los ratones CD3DH es mayor que en los ratones CD3 δ KO (Fig. R4), lo que confirma el papel clave que juega la cadena CD3 γ en las células T $\gamma\delta$ en ratón^{7, 121}. La reducción de la expresión del TCR $\gamma\delta$ en estos dos modelos podría indicar que CD3 δ es necesaria para la expresión de ciertas estructuras de señalización en determinadas subpoblaciones celulares durante la ontogenia T $\gamma\delta$. Para contrastar esta idea se empleó un método que permite detectar los posibles dímeros de CD3 $\delta\epsilon$ en la superficie de las células T $\gamma\delta$ (Fig. R5), sin embargo los tres modelos de ratón estudiados excluyen completamente la posibilidad de que el TCR $\gamma\delta$ incorpore en su superficie CD3 δ , incluso en una subpoblación minoritaria. Por lo tanto, sí CD3 δ es sintetizada en cantidades similares en las células T $\gamma\delta$ y las células T $\alpha\beta$ ^{82, 112} debe considerarse que la reducción de la cantidad de la cadena CD3 δ , en el contexto de haploinsuficiencia de *Cd3g*, afecte al ensamblaje del receptor TCR $\gamma\delta$ en el interior celular (por ejemplo, en la situación de un receptor inmaduro). En esta línea, hemos comprobado que la cadena CD3 δ presenta una menor movilidad electroforética en los timocitos totales de los ratones CD3DH (Fig. R6), lo que podría atribuirse a una glicosilación diferencial en comparación con los timocitos control (datos preliminares). Esto podría interferir en el correcto ensamblaje y estabilidad del complejo TCR $\gamma\delta$ y así tener un impacto indirecto sobre la expresión del mismo en superficie. Es importante destacar que se han descrito alteraciones en la glicosilación de CD3 δ con anterioridad, por ejemplo, en células humanas deficientes de CD3 γ ⁹⁶ y en el ratón doble deficiente de CD3 γ y CD3 δ que expresa una cadena transgénica CD3 δ humana⁹⁸, asociadas en ambos casos a una expresión del TCR por debajo de lo normal. Así, parece que la reducción en la disponibilidad intracelular de las cadenas CD3 γ y CD3 δ podría alterar la manera en la que estas proteínas se exponen a la maquinaria de glicosilación durante el ensamblaje y/o transporte del complejo TCR a la superficie celular. Parece claro entonces, que la cadena CD3 δ tiene un impacto directo sobre el desarrollo de las células T $\gamma\delta$, aunque tampoco podría descartarse la posibilidad de una hiperglicosilación de CD3 γ ¹²¹, sobre todo en estados tempranos del desarrollo cuando la expresión de CD3 γ predomina sobre la de CD3 δ , y con afectación final sobre el ensamblaje, la expresión en superficie y la capacidad de señalización del complejo TCR $\gamma\delta$.

3. EFECTOS SELECTIVOS DE LINAJE

Independientemente del mecanismo implicado, los ratones CD3DH permitieron abordar la implicación del TCR en el desarrollo de las células $T\gamma\delta$ pro-inflamatorias en el timo. Para ello analizamos la capacidad de producir $IFN-\gamma$ vs $IL-17$ en distintos puntos de la ontogenia y desarrollo del ratón. Lo primero que observamos fue que la producción de $IFN-\gamma$ por parte de las células $T\gamma\delta$ $CD27^+$ del ratón CD3DH se encontraba reducida en todos los puntos del análisis comparado con el control (Fig. R11). Al menos existen dos posibles explicaciones para este hallazgo: un problema específico de cada célula $T\gamma\delta$ $CD27^+$ (la célula presenta una menor capacidad para producir esta citoquina) o podría ser que alguna subpoblación específica con capacidad para producir $IFN-\gamma$ estuviera ausente en los ratones CD3DH. Analizando en profundidad las células CD3DH $T\gamma\delta$ $CD27^+$, pudimos comprobar cómo una subpoblación específica dentro de este grupo ($T\gamma\delta$ $CD27^+$ $CD122^+$ $NK1.1^+$) se encontraba ausente en los ratones con haploinsuficiencia combinada (Fig. R15). Posteriormente, analizamos esta subpoblación en ratones control para conocer sus características y comprobamos que presenta una elevada expresión de marcadores típicos de selección agonista (Fig. R16), así como una elevada capacidad para producir $IFN-\gamma$. Por lo tanto, se demuestra en este caso que la población $T\gamma\delta$ $CD27^+$ $CD122^+$ $NK1.1^+$ con capacidad para producir $IFN-\gamma$ depende para su desarrollo de una elevada señalización (en términos de intensidad) vía $TCR\gamma\delta$ y está reducida en los ratones CD3DH ya que esta señalización es menor.

4. EFECTOS SELECTIVOS DE REPERTORIO

Analizando en detalle el repertorio $V\gamma$ de las células $CD27^+$ en el timo de ratones control, se puede comprobar cómo las células más abundantes de este subgrupo ($CD122^-$ $NK1.1^-$) son $V\gamma4^+$. Sin embargo, al analizar las células $CD122^+$ $NK1.1^+$ para este mismo repertorio, se observó cómo la mayoría de ellas eran $V\gamma1^+$, lo que sugeriría que realmente existe una selección de este tipo de $V\gamma$ (Fig. R16b). Así, podría existir una transición desde el grupo de células mayoritarias hacia los otros dos grupos estudiados (se sabe que estos dos marcadores se expresan cuando reciben una intensidad fuerte de señal vía $TCR\gamma\delta^{37}$), ya sea un desarrollo escalonado o dividido dependiente de la intensidad de la señal (Fig. D1) como se ha descrito anteriormente.

5

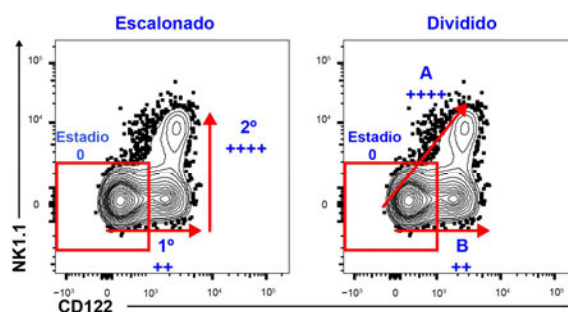


Figura D1. Modelos de desarrollo de las células $T\gamma\delta$ $CD27^+$ en el timo. (a) Vía de diferenciación escalonada: células $CD122^-$ $NK1.1^-$ (Estado 0) que reciben señal media se dirigen primero hacia $CD122^+$ $NK1.1^-$ ($1^{\circ}++$) y dentro de estas las que reciben una señal más fuerte se convierten en $CD122^+$ $NK1.1^+$ ($2^{\circ}++++$). (b) Vía dividida: las células $CD122^-$ $NK1.1^-$ (Estado 0) reciben una señal débil y dentro de estas, si reciben una señal de mediana intensidad se dirigen hacia el Estado $CD122^+$ $NK1.1^-$ (B) o si reciben una señal muy fuerte se dirigen hacia el Estado $CD122^+$ $NK1.1^+$ (A).

Obviamente, en los ratones CD3DH, al reducirse significativamente las células $T\gamma\delta$ $CD27^+$ $CD122^+$ $NK11^+$, el compartimento $V\gamma1^+$ se encuentra afectado, por lo que se podría inferir que este tipo de células son las más dependientes de una intensidad fuerte de señal vía TCR, aunque hay que destacar que dentro del grupo $T\gamma\delta$ $CD27^+$ $CD122^+$ $NK11^+$ no solo se engloban las células $V\gamma1^+$ (Fig. R16b). De esta manera, se podría afirmar que existen células que dependen de una intensidad fuerte de la señal con un repertorio $V\gamma$ variable. En este contexto, es muy importante puntualizar que las células $V\gamma1.1^+$ históricamente se han relacionado con una señal TCR muy fuerte, además están estrechamente relacionadas con el factor de transcripción PLZF¹²² y la expresión de NK1.1 (se conoce con detalle la expresión de NK1.1 durante la ontogenia¹²³). Estas células NK1.1⁺ se han estudiado extensivamente y se consideran *per se* un grupo de células $T\gamma\delta$ innatas ($T\gamma\delta$ *innate-like*) productoras de IFN- γ ^{79, 124}. Consecuentemente, parecía lógico estudiar el factor de transcripción PLZF en nuestros ratones, pues teóricamente podría tratarse de un gen candidato y apropiado para entender nuestros resultados. Además, este factor de transcripción es un actor fundamental en el desarrollo de células $T\gamma\delta$ $V\gamma6^+$ IL-17⁺¹²⁵, que precisamente se encuentran afectadas en el ratón CD3DH (Fig. R11). Al realizar el análisis por citometría de flujo intracelular, no obtuvimos ninguna diferencia entre los ratones control y los ratones CD3DH para la expresión de PLZF. Este hallazgo podría parecer incoherente, pero en contra de lo que se asume en la comunidad científica, dentro de las células $V\gamma1.1^+$ no todas son igualmente dependientes de PLZF: existe un grupo de células $V\gamma1.1^+$ que no expresan este factor de transcripción¹²⁶, poniendo así en duda la clasificación normalmente aceptada para las células $T\gamma\delta$ con características innatas²³. Así, podríamos entender que dentro de las células $T\gamma\delta$ $CD27^+$ $CD122^+$ $NK1.1^+$ existen distintas células ($V\gamma4$, $V\gamma1$, $V\gamma1.1^+$ PLZF⁺, $V\gamma1.1^+$ PLZF⁻) y aunque todas dependen de una intensidad fuerte de la señal para su desarrollo presentan características diferenciales, de hecho se han descrito características diferenciales durante el desarrollo de las células $V\gamma1.1^+$ PLZF⁻ y células $T\gamma\delta$ *NKT-like*⁴⁷. También podría suceder que no todas las células dentro de este compartimento fueran realmente dependientes de una intensidad fuerte de la señal, pero que necesiten una interacción directa con las células que sí lo son o con las citoquinas sintetizadas por ellas, y por esta razón también estarían ausentes o en poca proporción en los ratones CD3DH (de hecho las únicas células que parecen mantenerse en el ratón CD3DH expresan CD69 por lo que presentan características NKT¹²⁷). Por otra parte, al realizar el análisis de los elementos $V\gamma$ en las células $T\gamma\delta$ $CD27^+$ $CD122^-$ $NK1.1^-$ de ratones control, mayoritariamente son $V\gamma4^+$ (Fig. R16b); sin embargo, en los ratones CD3DH podemos comprobar cómo el porcentaje de $CD27^+$ $V\gamma4^+$ se reduce (aumentándose en células $CD27^-$). Este hallazgo recuerda la descripción de Chien *et al.*³⁷ en un ratón transgénico que solo expresa un TCR $V\gamma4$: en presencia del ligando de este TCR (T22/T10), es capaz de adquirir la impronta propia de aquellas células que han recibido señal fuerte a través del receptor ($CD122^+$, $NK1.1^+$), expresan $CD27$ y producen IFN- γ . Sin embargo, en ausencia de dicho ligando las células adquieren características propias de células productoras de IL-17. Esto podría explicar que, las células realmente dependientes de señal fuerte desaparezcan en el ratón CD3DH ($CD27^+$ $CD122^+$ $NK11^+$) y que al bajar el nivel de la intensidad de la señal, las células $V\gamma4^+$ se dirijan hacia una impronta tipo IL-17, pues la señal que reciben es mucho más baja que en los ratones control. Consecuentemente, este hecho nos permitiría definir una dependencia de la señal variable en los distintos tipos de $V\gamma$ analizados en los ratones CD3DH.

5. MECANISMO INTRÍNSECO (QUIMERAS)

Una vez caracterizados estos defectos de los ratones CD3DH, era necesario establecer con criterio que los resultados observados eran debidos a un defecto intrínseco de la célula y no a una alteración extrínseca derivada de la modificación genética, como podría ser un nicho alterado/incompleto o una comunicación truncada con otras células presentes en este nicho.

Para ello se generaron ratones quiméricos de médula ósea mixta de origen control (WT.Thy-1.1) y CD3DH (CD3DH.Thy-1.2) a ratios diferentes (1:1 o 1:9). En este contexto, se había descrito que era imposible generar células $T\gamma\delta$ productoras de IL-17 con precursores hematopoyéticos adultos⁷⁶; por lo tanto, sólo se pudo estudiar el impacto de esta reconstitución competitiva sobre la población afectada en los ratones CD3DH ($CD27^+$ en general y $CD27^+ CD122^+ NK11^+$ en particular). Los resultados de estos análisis en los ratones quiméricos 1:1 ponen de manifiesto una reducción en los niveles de expresión del $TCR\gamma\delta$ en los timocitos derivados de ratones CD3DH y representan además una fracción menor del total de timocitos $T\gamma\delta$ comparados con los derivados de ratones control, mientras que las células $T\alpha\beta$ se encuentran igualmente representadas por timocitos procedentes de precursores control o CD3DH (Fig. R9). Esto demuestra que estos últimos son superados por los progenitores control en una situación de reconstitución competitiva, única y exclusivamente para el desarrollo de células $T\gamma\delta$ y no de $T\alpha\beta$. Si aumentamos la relación de precursores de origen WT:CD3DH hasta una proporción de 1:9, esta desventaja puede ser compensada, lo que manifiesta la viabilidad y capacidad de estos precursores CD3DH para generar células $T\gamma\delta$, pero no la subpoblación $T\gamma\delta CD27^+ CD122^+ NK11^+$ (Fig. R15). Estos resultados refuerzan la idea de que los progenitores CD3DH, en una situación de nicho completo, presentan una desventaja competitiva sobre los progenitores de origen control para reconstituir las células $T\gamma\delta$, y especialmente para generar las células $T\gamma\delta CD27^+ CD122^+ NK11^+$.

6. REVERSIÓN DEL DEFECTO

Tras confirmar que los resultados observados eran debidos a un defecto intrínseco de la célula y no a una alteración extrínseca en el nicho donde se desarrollaban estas células derivada de la modificación genética, nos preguntamos si podría revertirse el defecto encontrado en los ratones CD3DH aplicando una señal fuerte vía TCR de manera extrínseca con la administración de un anticuerpo dirigido contra los dímeros $CD3\gamma\epsilon$ (clon 17A2). Aunque la acción de este anticuerpo no se asemeja a ningún estímulo fisiológico¹⁰⁹ que pudiera encontrar la célula $T\gamma\delta$ durante su desarrollo en el timo, lo que se buscaba era una agregación de los receptores que se encuentran en la superficie. Esta estimulación dispararía, teóricamente, la máxima señalización posible en los timocitos $T\gamma\delta$. Este experimento resulta relevante para nuestro estudio, pues nos permite determinar (aunque no sea en condiciones fisiológicas) si el ratón CD3DH mantenía la capacidad de generar células $T\gamma\delta CD27^+ CD122^+ NK1.1^+$ en el timo. Sorprendentemente, se observó en el ratón control que la población $T\gamma\delta CD27^+ CD122^+ NK1.1^+$ aumentaba casi el triple en el timo pero no en periferia, donde solo aumentaba ligeramente tras la administración del anticuerpo (datos no mostrados), indicando así que la dependencia de estas células por una señal fuerte del TCR es específica del timo, donde se generan y desarrollan, poniendo de manifiesto nuevamente la reducida plasticidad de estas células en periferia⁴⁸. Se demostró además, que los ratones CD3DH tratados con anticuerpo recuperan la generación de las células $T\gamma\delta CD27^+ CD122^+ NK1.1^+$ (Fig. 17), demostrando nuevamente de manera inequívoca que la ausencia de esta población en los ratones CD3DH se debe a la reducción de la señal vía $TCR\gamma\delta$. Otro hecho que se podría discutir a tenor de estos resultados es la ausencia de células $T\gamma\delta CD27^+ CD122^+ NK1.1^-$ tras el tratamiento con el anticuerpo. La población negativa para la expresión de $CD122$ y $NK1.1$ que recibe una señal fuerte vía TCR se convertiría en $CD122^+ NK1.1^+$ sin pasar por ningún estado intermedio, lo que apoyaría el modelo de “desarrollo dividido” descrito anteriormente (Fig. D1). Cabe destacar, que *in vitro* se ha descrito la recapitulación de estos resultados, ya que en un sistema de co-cultivo con OP9-DL1, y en presencia de anticuerpos anti- $TCR\gamma\delta$, se da el mismo proceso de generación en el timo de células ($T\gamma\delta CD27^+ CD122^+ NK1.1^+$) que dependen de señalización fuerte desde el $TCR\gamma\delta$ ¹²⁸. Todos estos datos nos permitieron

interpretar este fenotipo IFN- γ observado en los ratones CD3DH basándonos en el modelo propuesto por Zarim *et al.*, 2014⁶⁸ y que se describió en el capítulo de la introducción (Fig I5).

7. EFECTOS EN EMBRIÓN VS ADULTO

Por otra parte, también se comprobó que las células $T\gamma\delta^+ CD27^- IL-17^+$ de los ratones CD3DH se encontraban afectadas durante la fase embrionaria en comparación con los ratones control (Fig. R11). Sin embargo, cuando se completaba el desarrollo del ratón, estas diferencias se iban haciendo menores hasta el punto de que en estado adulto no se aprecian desigualdades en la producción de IL-17 entre el ratón control y el ratón CD3DH. Para entender cómo pueden existir diferencias en el estado embrionario pero no en el adulto, es importante tener en cuenta que las células $T\gamma\delta$ se generan en ondas durante el desarrollo embrionario^{70, 76} y estas ondas están estrechamente relacionadas con el uso de distintos elementos $V\gamma^{129}$ (Fig. I6). En el timo de un ratón que se encuentra en la fase final de su desarrollo gestacional (E18), la mayoría de las células $T\gamma\delta IL-17^+$ son $V\gamma6^+$, sin embargo en los días posteriores a su nacimiento son mayoritariamente $V\gamma4^+$ (Fig. D2). Así, el fenotipo de las células $T\gamma\delta IL-17^+$ en los ratones CD3DH es indicativo de que las células $V\gamma6^+$ presentan una dependencia de señal fuerte del $TCR\gamma\delta$ para su desarrollo, mientras que las células $V\gamma4^+$ no. Lo que podría explicar que las células $V\gamma6^+$ muestren evidencias de selección TCR CDR3 restringida⁶³, a pesar de que ambas estén englobadas dentro de las $T\gamma\delta IL-17^+$. Además, las células $T\gamma\delta IL-17^+ V\gamma6^+$ se han descrito como las células con mayor expresión de TCR dentro de las células $T\gamma\delta^{130}$ lo que podría advertir de su elevada dependencia de señalización $TCR\gamma\delta$ y que se encuentren afectadas en el caso de los ratones CD3DH.

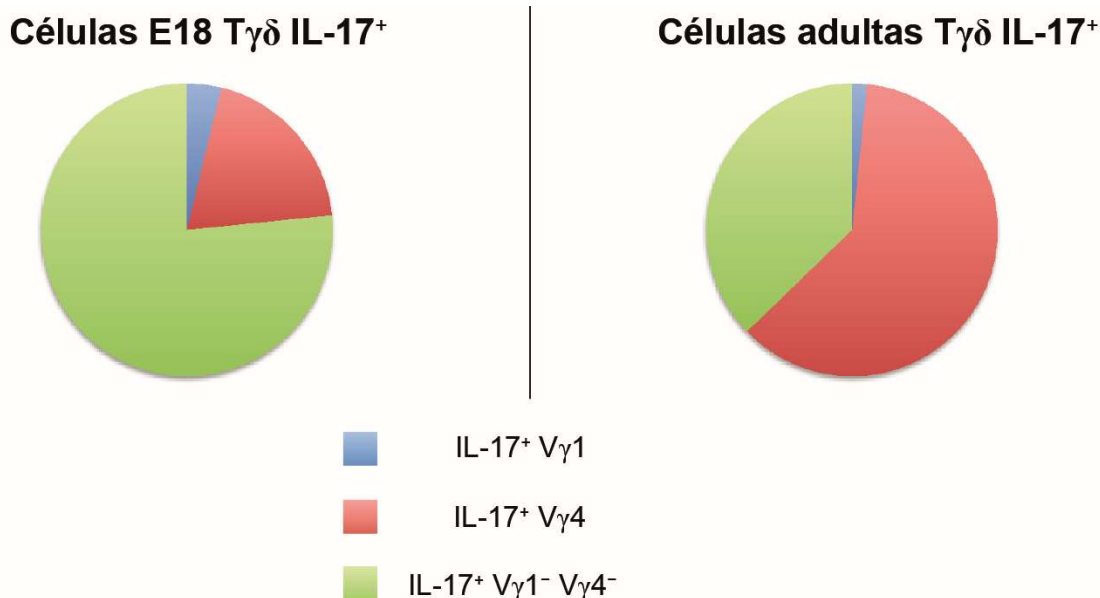


Figura D2. Uso diferencial de los distintos elementos $V\gamma$ en células $T\gamma\delta IL-17^+$ durante el desarrollo del ratón. Izquierda: uso $V\gamma$ en células $T\gamma\delta IL-17^+$ de timo de ratones recién nacidos/E18. Derecha: uso $V\gamma$ en células $T\gamma\delta IL-17^+$ de timo de ratones adultos. Las células durante el estado embrionario tardío y neonato son $V\gamma1^- V\gamma4^-$ y en su mayoría fueron validadas como $V\gamma6^{+40}$.

Esta diferencia también se refleja en los niveles de expresión de *Sox4* y *Sox13* en timocitos $V\gamma6^+$ y $V\gamma4^+$ de ratones CD3DH en comparación con el control (Fig. R13b). Nuestros datos ponen de manifiesto nuevamente (ya fue propuesto por Kang *et al.*⁷³) que las células $V\gamma6^+ IL-17^+$ y las $V\gamma4^+ IL-17^+$ tienen requerimientos diferenciales durante su desarrollo en el timo³⁶. Además de estas divergencias, se han descrito otras características diferenciales entre estas células, por ejemplo,

las células $V\gamma 6^+$ son más competitivas que las $V\gamma 4^+$ a la hora de reconstituir la dermis de ratones deficientes de células $T\gamma\delta$ ³⁶. Por otro lado, las células $V\gamma 6^+$ (de origen fetal), son residentes *bona fide* de la dermis, sin embargo, las células $V\gamma 4^+$ que se desarrollan a partir de progenitores de médula ósea de adulto dependen más de señales extratímicas para dirigirse hacia la piel^{36, 131} (sugiriendo una menor dependencia del TCR durante su desarrollo, como se observa en las células $V\gamma 4^+$ de ratones CD3DH), donde constituyen la mayor fuente de IL-17 en situaciones de inflamación asociadas a psoriasis⁷⁶. De esta manera, estos datos ponen de nuevo de manifiesto la “flexibilidad” de las células $V\gamma 4^+$ observada en nuestros ratones (cuando las células $V\gamma 4^+$ varían sus características fenotípicas dependiendo de la intensidad de la señal). Además, se ha observado una contribución diferencial en la producción de IL-17 de las células $V\gamma 6^+$ y $V\gamma 4^+$ en distintos escenarios⁷⁸. Por ejemplo, las células $V\gamma 4^+$ predominan en la encefalitis autoinmune experimental (EAE)³⁸ y en la artritis inducida por colágeno (CIA)¹³², mientras que las células $V\gamma 6^+$ son más frecuentes en infección por *Listeria*³³ y cáncer de ovario⁴⁰. Por lo tanto, las diferencias observadas en el desarrollo tímico pueden tener una importante consecuencia fisiopatológica.

Estos datos permiten concluir que las células $T\gamma\delta$ productoras de IL-17 de origen fetal y origen adulto tienen distintos requerimientos de intensidad de señal a través del TCR. Esta conclusión sirve además para re-evaluar la controversia previa sobre el desarrollo de las células $T\gamma\delta$ IL-17⁺, que obviamente no podía ser solucionada con el uso de animales $TCR\gamma\delta$ transgénicos (como pueden ser el G8 y KN6, ambos $V\gamma 4^{+59}$) que han servido para interpretar que las células $T\gamma\delta$ con capacidad para producir IL-17 no requieren señalización del TCR para su desarrollo³⁷. Así, nuestros datos indican que dentro del subtipo de células $T\gamma\delta$ IL-17⁺, las células $V\gamma 6^+$ tienen una dependencia de señal a través del TCR mayor que las $V\gamma 4^+$. Estas últimas, que no son generadas exclusivamente en el timo fetal, en periferia serían más dependientes de diferentes señales homeostáticas¹³¹. De este modo se abre una nueva puerta para el estudio en profundidad de los requerimientos específicos de las células $V\gamma 6^+$ y $V\gamma 4^+$. Además, nuestros resultados indican que las distintas ventanas/ondas de desarrollo de los linfocitos $T\gamma\delta$ en el timo definidas por los reordenamientos $TCRG/V\gamma$ presentan requerimientos diferenciales en relación a la intensidad de la señal del TCR para su diferenciación en células productoras de IFN- γ o IL-17, resolviendo así la polémica existente sobre el papel del TCR en este proceso (Fig. D3). Sería importante destacar aquí que el modelo que originó esta controversia (deficiencia de *Skint-1*), es el único ratón de todos los discutidos en este trabajo que presenta un fondo genético diferente a C57BL/6N⁶¹, por lo tanto cualquier comparación directa con el resto de modelos debe ser tomada en consideración debido a la diferencia existente entre cepas de ratones.

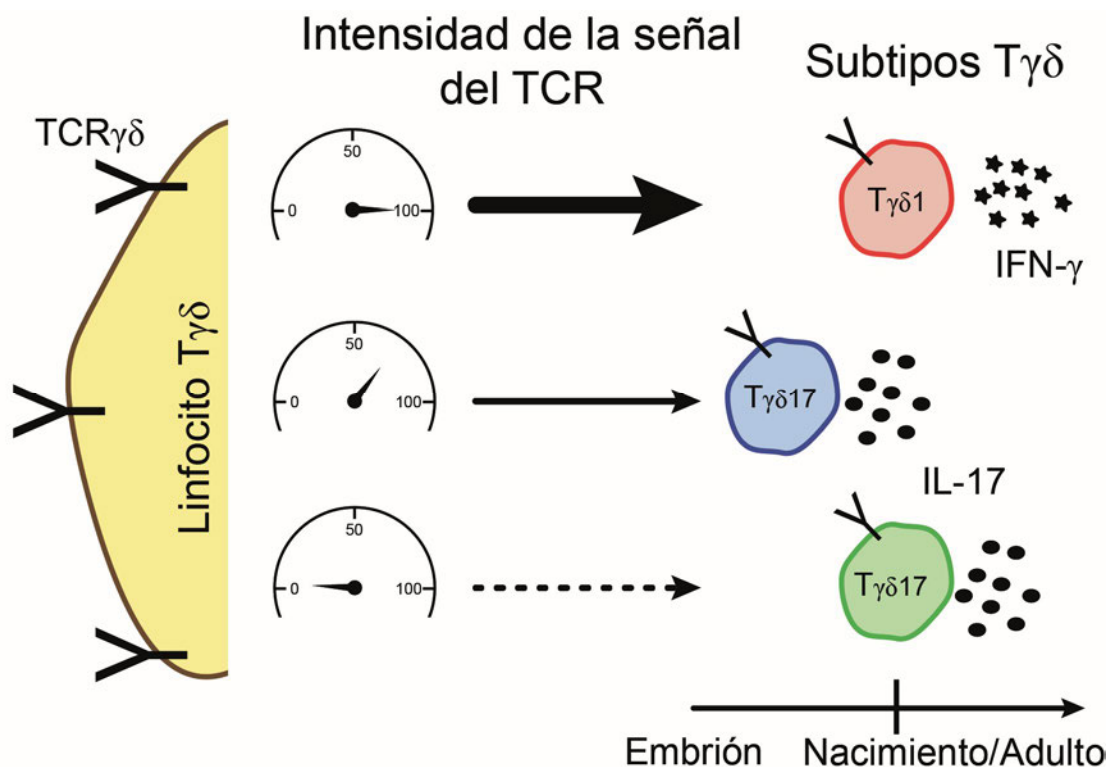


Figura D3. Modelo revisado del impacto de la intensidad de la señal del TCR $\gamma\delta$ para el desarrollo de las células T $\gamma\delta$ efectoras. Se ha demostrado mediante la alteración *in vivo* de la señalización del TCR que tanto los linfocitos T $\gamma\delta$ IFN- γ ⁺ como algunos de los T $\gamma\delta$ IL-17⁺ requieren señalización fuerte desde el TCR, pero en distintos momentos de su desarrollo.

Además de la presencia de ligando, las características intrínsecas del propio receptor (como el tipo de V γ , la conformación del TCR o su ensamblaje con los dominios de señalización) podrían ser relevantes para entender el fenotipo de los ratones con haploinsuficiencia combinada de *Cd3*. En relación con estas características, por ejemplo, sabemos que el “cambio conformacional” en el TCR (cambio en la cadena CD3 ϵ tras la activación que provoca la exposición de su secuencia PRS, permite la interacción con Nck y es imprescindible para la activación completa de la célula¹³³) determina diferencialmente el desarrollo de los subconjuntos de células T $\gamma\delta$ en el timo de ratones⁴⁷ y se ha descrito que este cambio conformacional no está inducido por antígeno en el TCR $\gamma\delta$ (pero sí en el TCR $\alpha\beta$) al menos en un ratón transgénico que solo expresa un TCR V γ 4¹³⁴. Además, como ya se ha mencionado en las células T $\gamma\delta$ específicas para T10 y T22, el reconocimiento de ligando es un paso clave para su desarrollo a células productoras de IFN- γ , aunque trabajos posteriores pusieron de manifiesto que esto no era aplicable para todas las células T $\gamma\delta$ ¹⁴. Por ejemplo, el grupo de Silva-Santos demostró que timocitos E14 de ratones RAG2KO transducidos con vectores retrovirales que expresaban cadenas V γ 7 y cadenas V γ 5 que carecían del dominio extracelular encargado de la unión de ligando, tenían niveles normales de expresión de genes como *Ifng* y *Tbx21*⁵⁶. Lo que no se correlaciona con los datos obtenidos en los ratones deficientes de Skint-1, donde la interacción con ligando por parte de las células V γ 5⁺ parece básica para su desarrollo⁶¹. De esta manera, podemos concluir sobre estos datos que diferentes TCR $\gamma\delta$ podrían usar mecanismos de señalización tanto dependientes como independientes de ligando, recordando así lo que sucede en el pre-TCR durante la selección β en los progenitores T $\alpha\beta$ ¹³⁵. Sin embargo, este no es el único aspecto a tener en cuenta en este contexto; también sería muy interesante comprobar el papel que juegan las distintas cascadas de señalización dependientes del TCR $\gamma\delta$ en el desarrollo funcional de las células T $\gamma\delta$, pues se sabe que tienen un papel importante en estados previos del desarrollo¹³⁶. Así, sería significativo establecer si la señal a través del TCR juega un papel cualitativo o cuantitativo basado en las

diferentes rutas que se puedan poner en marcha tras su activación¹³⁷ (Pennington *et al.*, comunicación personal). En este contexto es importante destacar que aunque la mayoría de las células T $\gamma\delta$ V γ 5⁺/V γ 1⁺ y V γ 4⁺/V γ 6⁺ se diferencian en productoras de IFN- γ o IL-17 respectivamente, se sabe que existen algunas células V γ 1⁺ que sintetizan IL-17 y una fracción de V γ 4⁺ que se convierten en productoras de IFN- γ (de hecho, las células V γ 4⁺ CD44⁺ juegan un papel protector clave en la inmunidad tumoral a través de la secreción de IFN- γ ¹³⁸); además, en los ratones CD3DH algunas de las células T $\gamma\delta$ CD27⁺ CD122⁺ NK1.1⁺ afectadas (productoras de IFN- γ) eran V γ 4⁺. Por lo tanto, la disección de las señales que hacen que células que expresan un mismo TCR $\gamma\delta$ (V γ 4 en este caso como ejemplo) se conviertan en productoras de IL-17 o de IFN- γ podría esclarecer los mecanismos por los que el TCR regula la diferenciación efectora de las células T $\gamma\delta$: ¿es esta una cuestión de la calidad/intensidad/duración de la señal del TCR?; ¿es un evento pre-programado?; ¿es realmente dependiente de TCR?

8. IMPACTO TRANSCRIPCIONAL

En relación a la programación celular inducida por el TCR, nuestro análisis transcripcional en linfocitos T $\gamma\delta$ totales (más adelante en este capítulo se discutirá porqué se seleccionó esta población) entre estados embrionarios y adultos, reveló que el ratón CD3DH es capaz de regular negativamente (apagado) el programa de expresión de IL-17, pero muestra una clara alteración en la regulación positiva (encendido) de la expresión de IFN- γ durante la ontogenia. Esta desregulación incluye genes como *Nr4a3*, *Nr4a2* y *Bcl2a1*, que son dependientes de CD27/LT β R y están relacionados con la producción de IFN- γ además de controlar la regulación de los precursores de timocitos T $\gamma\delta$ por los precursores de células T $\alpha\beta$ ¹³⁹; también, dependen de los factores de transcripción *Egr2*, *Egr3* e *Id3* implicados en este proceso por dos hechos diferenciales: por un lado son importantes supresores de la vía de diferenciación IL-17⁶¹, y por otro lado se ha descrito recientemente que son inducidos tras una señal fuerte/agonista a través del TCR^{65, 140}. En este contexto de ratones CD3DH, estos genes serían críticos para suprimir una programación IL-17 establecida posiblemente por defecto y para maximizar la producción de IFN- γ por parte de los timocitos T $\gamma\delta$ (Fig. R13). Además, estos datos son consistentes con los hallazgos en células V γ 5⁺ (la identificación en el timo adulto de una red de genes reguladores controlados por el TCR $\gamma\delta$ y relacionados con la producción de IFN- γ ⁶¹) y también con la ausencia en los ratones CD3DH de la población T $\gamma\delta$ CD27⁺ CD122⁺ NK1.1⁺, pues se trata del subtipo que expresa los niveles más elevados de IFN- γ por célula. Como punto destacable en este análisis transcripcional, se puede decir que los factores de transcripción “maestros” que controlan la expresión de *Ifng* e *Il17a*, como son *T-bet* y *Ror γ t*, respectivamente, no se encuentran afectados durante la ontogenia del ratón CD3DH, sugiriendo que su fenotipo de diferenciación T $\gamma\delta$ deriva de un mecanismo independiente de estos factores de transcripción, tal y como sucede en los timocitos T $\gamma\delta$ deficientes de *Itk*⁷³. Por tanto, podríamos asumir que la principal función de la señalización vía TCR es la selección de precursores pre-programados, probablemente similares a las células ILC, capaces de diferenciarse en subtipos productores de citoquinas análogas pero sin la intervención de un receptor como el TCR. Sin embargo, una intensidad de señal fuerte a través del TCR también podría reprogramar potenciales productores de IL-17 que sobre-expresan represores de *Ror γ t*, como *Egr2* y *Egr3*, y así globalmente favorecer la producción de IFN- γ por parte de los linfocitos T $\gamma\delta$. Sobre la opción de seleccionar la población total de células T $\gamma\delta$ para el análisis transcripcional, hay que tener en cuenta que la población que desaparece en los ratones CD3DH es una pequeña fracción de las células T $\gamma\delta$ totales, por lo tanto es imposible establecer una comparación directa con los ratones control. Por otro lado, si seleccionamos única y exclusivamente las células CD122⁺ podríamos sobre-estimar los resultados, y podría ocurrir que algunos genes candidatos que afecten en concreto a esa población (por ejemplo, PLZF¹²⁴ y ThPOK^{66, 141}) y otros no tan específicos se vean alterados por

el mero hecho de que la población específica se encuentra ausente en los ratones CD3DH. Por ello se decidió realizar este análisis sobre la población total de células $T\gamma\delta$, para así tener una idea general sobre el impacto de la reducción de la señal del TCR en el conjunto total de células, asumiendo que posiblemente pueda existir algún candidato desconocido implicado directamente sobre el desarrollo de esta población y que sería muy difícil de identificar técnicamente. Por otra parte, los experimentos de ganancia de función demuestran claramente a nivel transcripcional, que las señales fuertes a través del TCR favorecen la producción de IFN- γ a expensas de IL-17 en timocitos adultos $T\gamma\delta$ (Fig. R14).

9. IMPACTO FISIOPATOLÓGICO

Por último, para estudiar la relevancia de las células $T\gamma\delta$ CD27⁺ CD122⁺ NK1.1⁺ en un contexto de enfermedad, se utilizó un modelo de patología dependiente de IFN- γ . En el laboratorio de Bruno Silva-Santos se está estudiando el desarrollo de malaria cerebral y la implicación de las células $T\gamma\delta$ en esta patología. Se sabe que las células $T\gamma\delta$ juegan un papel fundamental en la defensa contra el parásito durante la fase inicial de la enfermedad en el hígado. Pasada esta ventana temporal (en torno a 5 días) el esporozoito sale a la sangre y provoca una respuesta inflamatoria dependiente de IFN- γ en el cerebro, que resulta en la muerte del animal. Los ratones deficientes de células $T\gamma\delta$ son totalmente resistentes a los efectos letales de la infección (Fig. R23). Por su parte, los ratones CD3DH presentan una supervivencia significativamente aumentada a la malaria cerebral experimental, en comparación con los animales control, lo que demuestra que las células $T\gamma\delta$ CD27⁺CD122⁺NK1.1⁺ productoras de IFN- γ (ausentes en los ratones CD3DH) son las principales responsables de la letalidad asociada a la malaria cerebral. Así se pone de manifiesto el papel crítico del TCR en la generación de subtipos de linfocitos $T\gamma\delta$ efectores que presentan una elevada relevancia fisiopatológica.

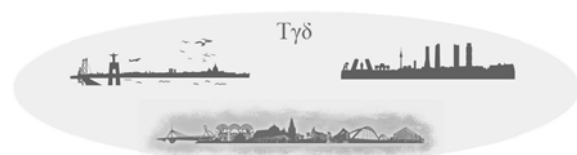
CONCLUSIONS



The analysis of the CD3 γ /CD3 δ double-haploinsufficient mouse model (CD3DH) sheds light on the role of these CD3 chains in TCR expression, and on the involvement of the TCR in the generation of effector $\gamma\delta$ T cell subsets in the thymus and their impact on pathophysiology. Accordingly, it can be concluded that:

1. The surface expression of the TCR $\gamma\delta$, but not of the TCR $\alpha\beta$, is critically regulated by the intracellular levels of CD3 γ and CD3 δ .
2. TCR signal strength controls thymic differentiation of discrete proinflammatory $\gamma\delta$ T cell subsets (those producing either IFN- γ or IL-17).
3. The generation of the IFN- γ -producing $\gamma\delta$ T cell subset, in particular of that secreting the highest levels of IFN- γ , depends critically on strong TCR signals and the resulting transcriptional signature associated with IFN- γ expression.
4. The differentiation of the IL-17-producing subset expressing V γ 6, which is generated exclusively during early embryonic life, depends also on strong TCR signaling; while the V γ 4-expressing subtype appearing later in ontogeny does not exhibit such requirement.
5. IFN- γ -producing $\gamma\delta$ T cells are the pathogenic subtype in the context of experimental cerebral malaria, which highlights the critical role of the TCR in the development of effector $\gamma\delta$ T cells with relevance to pathophysiology.

BIBLIOGRAFÍA



1. Litman, G.W., Rast, J.P. & Fugmann, S.D. The origins of vertebrate adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* **10**, 543-553 (2010).
2. Recio, M.J. *et al.* Differential biological role of CD3 chains revealed by human immunodeficiencies. *Journal of immunology* **178**, 2556-2564 (2007).
3. Weiss, A. & Littman, D.R. Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* **76**, 263-274 (1994).
4. Dyall, R., Fremont, D.H., Jameson, S.C. & Nikolic-Zugic, J. T cell receptor (TCR) recognition of MHC class I variants: intermolecular second-site reversion provides evidence for peptide/MHC conformational variation. *The Journal of experimental medicine* **184**, 253-258 (1996).
5. Gil, D., Schrum, A.G., Alarcon, B. & Palmer, E. T cell receptor engagement by peptide-MHC ligands induces a conformational change in the CD3 complex of thymocytes. *The Journal of experimental medicine* **201**, 517-522 (2005).
6. Smith-Garvin, J.E., Koretzky, G.A. & Jordan, M.S. T cell activation. *Annual review of immunology* **27**, 591-619 (2009).
7. Siegers, G.M. *et al.* Different composition of the human and the mouse gammadelta T cell receptor explains different phenotypes of CD3gamma and CD3delta immunodeficiencies. *The Journal of experimental medicine* **204**, 2537-2544 (2007).
8. Kuhns, M.S., Davis, M.M. & Garcia, K.C. Deconstructing the form and function of the TCR/CD3 complex. *Immunity* **24**, 133-139 (2006).
9. Chien, Y.H., Meyer, C. & Bonneville, M. gammadelta T cells: first line of defense and beyond. *Annual review of immunology* **32**, 121-155 (2014).
10. von Boehmer, H. *et al.* The expression of CD4 and CD8 accessory molecules on mature T cells is not random but correlates with the specificity of the alpha beta receptor for antigen. *Immunological reviews* **109**, 143-151 (1989).
11. Schaible, U.E. & Kaufmann, S.H. CD1 molecules and CD1-dependent T cells in bacterial infections: a link from innate to acquired immunity? *Semin Immunol* **12**, 527-535 (2000).
12. Das, H., Wang, L., Kamath, A. & Bukowski, J.F. Vgamma2Vdelta2 T-cell receptor-mediated recognition of aminobisphosphonates. *Blood* **98**, 1616-1618 (2001).
13. Jensen, K.D. & Chien, Y.H. Thymic maturation determines gammadelta T cell function, but not their antigen specificities. *Current opinion in immunology* **21**, 140-145 (2009).
14. Wencker, M. *et al.* Innate-like T cells straddle innate and adaptive immunity by altering antigen-receptor responsiveness. *Nature immunology* **15**, 80-87 (2014).
15. Carding, S.R. & Egan, P.J. Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity. *Nat Rev Immunol* **2**, 336-345 (2002).
16. Davis, S.J. & van der Merwe, P.A. The kinetic-segregation model: TCR triggering and beyond. *Nat Immunol* **7**, 803-809 (2006).
17. Kuhns, M.S. & Davis, M.M. TCR Signaling Emerges from the Sum of Many Parts. *Front Immunol* **3**, 159 (2012).

18. Saito, H. *et al.* Complete primary structure of a heterodimeric T-cell receptor deduced from cDNA sequences. *Nature* **309**, 757-762 (1984).
19. Vantourout, P. & Hayday, A. Six-of-the-best: unique contributions of gammadelta T cells to immunology. *Nature reviews. Immunology* **13**, 88-100 (2013).
20. Baldwin, C.L. & Telfer, J.C. The bovine model for elucidating the role of gammadelta T cells in controlling infectious diseases of importance to cattle and humans. *Molecular immunology* **66**, 35-47 (2015).
21. Morita, C.T., Jin, C., Sarikonda, G. & Wang, H. Nonpeptide antigens, presentation mechanisms, and immunological memory of human Vgamma2Vdelta2 T cells: discriminating friend from foe through the recognition of prenyl pyrophosphate antigens. *Immunological reviews* **215**, 59-76 (2007).
22. Kalyan, S. & Kabelitz, D. Defining the nature of human gammadelta T cells: a biographical sketch of the highly empathetic. *Cell Mol Immunol* **10**, 21-29 (2013).
23. Fahl, S.P., Coffey, F. & Wiest, D.L. Origins of gammadelta T cell effector subsets: a riddle wrapped in an enigma. *Journal of immunology* **193**, 4289-4294 (2014).
24. Chen, L. *et al.* Epigenetic and transcriptional programs lead to default IFN-gamma production by gammadelta T cells. *J Immunol* **178**, 2730-2736 (2007).
25. Gao, Y. *et al.* Gamma delta T cells provide an early source of interferon gamma in tumor immunity. *The Journal of experimental medicine* **198**, 433-442 (2003).
26. Roark, C.L., Simonian, P.L., Fontenot, A.P., Born, W.K. & O'Brien, R.L. gammadelta T cells: an important source of IL-17. *Curr Opin Immunol* **20**, 353-357 (2008).
27. Lockhart, E., Green, A.M. & Flynn, J.L. IL-17 production is dominated by gammadelta T cells rather than CD4 T cells during Mycobacterium tuberculosis infection. *J Immunol* **177**, 4662-4669 (2006).
28. Wang, T. *et al.* IFN-gamma-producing gamma delta T cells help control murine West Nile virus infection. *Journal of immunology* **171**, 2524-2531 (2003).
29. Ferrick, D.A. *et al.* Differential production of interferon-gamma and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by gamma delta T cells in vivo. *Nature* **373**, 255-257 (1995).
30. Seixas, E.M. & Langhorne, J. gammadelta T cells contribute to control of chronic parasitemia in Plasmodium chabaudi infections in mice. *Journal of immunology* **162**, 2837-2841 (1999).
31. Jagannathan, P. *et al.* Loss and dysfunction of Vdelta2(+) gammadelta T cells are associated with clinical tolerance to malaria. *Science translational medicine* **6**, 251ra117 (2014).
32. Cho, J.S. *et al.* IL-17 is essential for host defense against cutaneous Staphylococcus aureus infection in mice. *The Journal of clinical investigation* **120**, 1762-1773 (2010).
33. Sheridan, B.S. *et al.* gammadelta T cells exhibit multifunctional and protective memory in intestinal tissues. *Immunity* **39**, 184-195 (2013).

34. Cai, Y. *et al.* Pivotal role of dermal IL-17-producing gammadelta T cells in skin inflammation. *Immunity* **35**, 596-610 (2011).
35. Pantelyushin, S. *et al.* Rorgammat+ innate lymphocytes and gammadelta T cells initiate psoriasiform plaque formation in mice. *The Journal of clinical investigation* **122**, 2252-2256 (2012).
36. Cai, Y. *et al.* Differential developmental requirement and peripheral regulation for dermal Vgamma4 and Vgamma6T17 cells in health and inflammation. *Nat Commun* **5**, 3986 (2014).
37. Jensen, K.D. *et al.* Thymic selection determines gammadelta T cell effector fate: antigen-naïve cells make interleukin-17 and antigen-experienced cells make interferon gamma. *Immunity* **29**, 90-100 (2008).
38. Sutton, C.E. *et al.* Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity* **31**, 331-341 (2009).
39. Petermann, F. *et al.* gammadelta T cells enhance autoimmunity by restraining regulatory T cell responses via an interleukin-23-dependent mechanism. *Immunity* **33**, 351-363 (2010).
40. Rei, M. *et al.* Murine CD27(-) Vgamma6(+) gammadelta T cells producing IL-17A promote ovarian cancer growth via mobilization of protumor small peritoneal macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, E3562-3570 (2014).
41. Pennington, D.J., Silva-Santos, B. & Hayday, A.C. Gammadelta T cell development--having the strength to get there. *Curr Opin Immunol* **17**, 108-115 (2005).
42. Shibata, K. *et al.* IFN-gamma-producing and IL-17-producing gammadelta T cells differentiate at distinct developmental stages in murine fetal thymus. *J Immunol* **192**, 2210-2218 (2014).
43. Kang, J. & Raulet, D.H. Events that regulate differentiation of alpha beta TCR+ and gamma delta TCR+ T cells from a common precursor. *Semin Immunol* **9**, 171-179 (1997).
44. Livak, F., Wilson, A., MacDonald, H.R. & Schatz, D.G. Alpha beta lineage-committed thymocytes can be rescued by the gamma delta T cell receptor (TCR) in the absence of TCR beta chain. *Eur J Immunol* **27**, 2948-2958 (1997).
45. Haks, M.C. *et al.* Attenuation of gammadeltaTCR signaling efficiently diverts thymocytes to the alphabeta lineage. *Immunity* **22**, 595-606 (2005).
46. Hayes, S.M., Li, L. & Love, P.E. TCR signal strength influences alphabeta/gammadelta lineage fate. *Immunity* **22**, 583-593 (2005).
47. Blanco, R., Borroto, A., Schamel, W., Pereira, P. & Alarcon, B. Conformational changes in the T cell receptor differentially determine T cell subset development in mice. *Sci Signal* **7**, ra115 (2014).
48. Schmolka, N. *et al.* Epigenetic and transcriptional signatures of stable versus plastic differentiation of proinflammatory gammadelta T cell subsets. *Nat Immunol* **14**, 1093-1100 (2013).

49. Ribot, J.C. *et al.* CD27 is a thymic determinant of the balance between interferon-gamma- and interleukin 17-producing gammadelta T cell subsets. *Nature immunology* **10**, 427-436 (2009).
50. Haas, J.D. *et al.* CCR6 and NK1.1 distinguish between IL-17A and IFN-gamma-producing gammadelta effector T cells. *European journal of immunology* **39**, 3488-3497 (2009).
51. Ribot, J.C., Debarros, A., Mancio-Silva, L., Pamplona, A. & Silva-Santos, B. B7-CD28 costimulatory signals control the survival and proliferation of murine and human gammadelta T cells via IL-2 production. *J Immunol* **189**, 1202-1208 (2012).
52. Ribot, J.C. & Silva-Santos, B. Differentiation and activation of gammadelta T Lymphocytes: Focus on CD27 and CD28 costimulatory receptors. *Adv Exp Med Biol* **785**, 95-105 (2013).
53. Munoz-Ruiz, M. *et al.* TCR signal strength controls thymic differentiation of discrete proinflammatory gammadelta T cell subsets. *Nat Immunol* (2016).
54. Narayan, K. *et al.* Intrathymic programming of effector fates in three molecularly distinct gammadelta T cell subtypes. *Nature immunology* **13**, 511-518 (2012).
55. Bonneville, M. *et al.* Recognition of a self major histocompatibility complex TL region product by gamma delta T-cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 5928-5932 (1989).
56. Mahtani-Patching, J. *et al.* PreTCR and TCRgammadelta signal initiation in thymocyte progenitors does not require domains implicated in receptor oligomerization. *Sci Signal* **4**, ra47 (2011).
57. Irving, B.A., Alt, F.W. & Killeen, N. Thymocyte development in the absence of pre-T cell receptor extracellular immunoglobulin domains. *Science* **280**, 905-908 (1998).
58. Stadanlick, J.E. *et al.* Tonic B cell antigen receptor signals supply an NF-kappaB substrate for prosurvival BLyS signaling. *Nature immunology* **9**, 1379-1387 (2008).
59. Bonneville, M. *et al.* Self-tolerance to transgenic gamma delta T cells by intrathymic inactivation. *Nature* **344**, 163-165 (1990).
60. Lewis, J.M. *et al.* Selection of the cutaneous intraepithelial gammadelta+ T cell repertoire by a thymic stromal determinant. *Nat Immunol* **7**, 843-850 (2006).
61. Turchinovich, G. & Hayday, A.C. Skint-1 identifies a common molecular mechanism for the development of interferon-gamma-secreting versus interleukin-17-secreting gammadelta T cells. *Immunity* **35**, 59-68 (2011).
62. Serre, K. & Silva-Santos, B. Molecular Mechanisms of Differentiation of Murine Pro-Inflammatory gammadelta T Cell Subsets. *Front Immunol* **4**, 431 (2013).
63. Itohara, S. & Tonegawa, S. Selection of gamma delta T cells with canonical T-cell antigen receptors in fetal thymus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 7935-7938 (1990).
64. Hayday, A.C. Gammadelta T cells and the lymphoid stress-surveillance response. *Immunity* **31**, 184-196 (2009).

65. Lauritsen, J.P. *et al.* Marked induction of the helix-loop-helix protein Id3 promotes the gammadelta T cell fate and renders their functional maturation Notch independent. *Immunity* **31**, 565-575 (2009).
66. Park, K. *et al.* TCR-mediated ThPOK induction promotes development of mature (CD24-) gammadelta thymocytes. *EMBO J* **29**, 2329-2341 (2010).
67. Negishi, I. *et al.* Essential role for ZAP-70 in both positive and negative selection of thymocytes. *Nature* **376**, 435-438 (1995).
68. Zarin, P., Chen, E.L., In, T.S., Anderson, M.K. & Zuniga-Pflucker, J.C. Gamma delta T-cell differentiation and effector function programming, TCR signal strength, when and how much? *Cell Immunol* **296**, 70-75 (2015).
69. Zeng, X. *et al.* gammadelta T cells recognize a microbial encoded B cell antigen to initiate a rapid antigen-specific interleukin-17 response. *Immunity* **37**, 524-534 (2012).
70. Prinz, I., Silva-Santos, B. & Pennington, D.J. Functional development of gammadelta T cells. *Eur J Immunol* **43**, 1988-1994 (2013).
71. Barbee, S.D. *et al.* Skint-1 is a highly specific, unique selecting component for epidermal T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 3330-3335 (2011).
72. D'Ombrain, M.C., Hansen, D.S., Simpson, K.M. & Schofield, L. gammadelta-T cells expressing NK receptors predominate over NK cells and conventional T cells in the innate IFN-gamma response to Plasmodium falciparum malaria. *Eur J Immunol* **37**, 1864-1873 (2007).
73. Malhotra, N. *et al.* A network of high-mobility group box transcription factors programs innate interleukin-17 production. *Immunity* **38**, 681-693 (2013).
74. Shibata, K. *et al.* Notch-Hes1 pathway is required for the development of IL-17-producing gammadelta T cells. *Blood* **118**, 586-593 (2011).
75. Korn, T. & Petermann, F. Development and function of interleukin 17-producing gamma delta T cells. *Ann Ny Acad Sci* **1247**, 34-45 (2012).
76. Haas, J.D. *et al.* Development of interleukin-17-producing gammadelta T cells is restricted to a functional embryonic wave. *Immunity* **37**, 48-59 (2012).
77. Bonneville, M., O'Brien, R.L. & Born, W.K. Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nature reviews. Immunology* **10**, 467-478 (2010).
78. O'Brien, R.L. & Born, W.K. gammadelta T cell subsets: a link between TCR and function? *Semin Immunol* **22**, 193-198 (2010).
79. Pereira, P., Gerber, D., Huang, S.Y. & Tonegawa, S. Ontogenic development and tissue distribution of V gamma 1-expressing gamma/delta T lymphocytes in normal mice. *J Exp Med* **182**, 1921-1930 (1995).
80. Garcillan, B. *et al.* Enrichment of the rare CD4(+) gammadelta T-cell subset in patients with atypical CD3delta deficiency. *J Allergy Clin Immunol* **133**, 1205-1208 (2014).

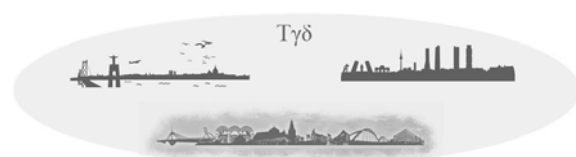
81. Gil, J. *et al.* A leaky mutation in CD3D differentially affects alphabeta and gammadelta T cells and leads to a Talpha-beta-Tgamma-delta+B+NK+ human SCID. *J Clin Invest* **121**, 3872-3876 (2011).
82. Hayes, S.M. & Love, P.E. Stoichiometry of the murine gammadelta T cell receptor. *The Journal of experimental medicine* **203**, 47-52 (2006).
83. Wucherpfennig, K.W., Gagnon, E., Call, M.J., Huseby, E.S. & Call, M.E. Structural biology of the T-cell receptor: insights into receptor assembly, ligand recognition, and initiation of signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a005140 (2010).
84. Call, M.E., Pyrdol, J. & Wucherpfennig, K.W. Stoichiometry of the T-cell receptor-CD3 complex and key intermediates assembled in the endoplasmic reticulum. *EMBO J* **23**, 2348-2357 (2004).
85. Call, M.E., Pyrdol, J., Wiedmann, M. & Wucherpfennig, K.W. The organizing principle in the formation of the T cell receptor-CD3 complex. *Cell* **111**, 967-979 (2002).
86. Weiss, A. Structure and function of the T cell antigen receptor. *J Clin Invest* **86**, 1015-1022 (1990).
87. Call, M.E. & Wucherpfennig, K.W. The T cell receptor: critical role of the membrane environment in receptor assembly and function. *Annu Rev Immunol* **23**, 101-125 (2005).
88. Rudd, P.M. *et al.* Roles for glycosylation of cell surface receptors involved in cellular immune recognition. *J Mol Biol* **293**, 351-366 (1999).
89. Ruddock, L.W. & Molinari, M. N-glycan processing in ER quality control. *J Cell Sci* **119**, 4373-4380 (2006).
90. Lowe, J.B. Glycosylation, immunity, and autoimmunity. *Cell* **104**, 809-812 (2001).
91. Alarcon, B., Swamy, M., van Santen, H.M. & Schamel, W.W. T-cell antigen-receptor stoichiometry: pre-clustering for sensitivity. *EMBO reports* **7**, 490-495 (2006).
92. Fischer, A., de Saint Basile, G. & Le Deist, F. CD3 deficiencies. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **5**, 491-495 (2005).
93. Dave, V.P. Hierarchical role of CD3 chains in thymocyte development. *Immunol Rev* **232**, 22-33 (2009).
94. Dave, V.P. *et al.* CD3 delta deficiency arrests development of the alpha beta but not the gamma delta T cell lineage. *EMBO J* **16**, 1360-1370 (1997).
95. Regueiro, J.R. *et al.* Familial defect of CD3 (T3) expression by T cells associated with rare gut epithelial cell autoantibodies. *Lancet* **1**, 1274-1275 (1986).
96. Zapata, D.A. *et al.* Biochemical differences in the alphabeta T cell receptor.CD3 surface complex between CD8+ and CD4+ human mature T lymphocytes. *J Biol Chem* **279**, 24485-24492 (2004).
97. Haks, M.C., Krimpenfort, P., Borst, J. & Kruisbeek, A.M. The CD3gamma chain is essential for development of both the TCRalpha-beta and TCRgamma-delta lineages. *EMBO J* **17**, 1871-1882 (1998).

98. Fernandez-Malave, E. *et al.* Overlapping functions of human CD3delta and mouse CD3gamma in alphabeta T-cell development revealed in a humanized CD3gamma-mouse. *Blood* **108**, 3420-3427 (2006).
99. Wang, B. *et al.* T lymphocyte development in the absence of CD3 epsilon or CD3 gamma delta epsilon zeta. *J Immunol* **162**, 88-94 (1999).
100. Thomassen, E.A. *et al.* The impact of single amino acid substitutions in CD3gamma on the CD3epsilongamma interaction and T-cell receptor-CD3 complex formation. *Hum Immunol* **67**, 579-588 (2006).
101. Munoz-Ruiz, M. *et al.* Human CD3gamma, but not CD3delta, haploinsufficiency differentially impairs gammadelta versus alphabeta surface TCR expression. *BMC immunology* **14**, 3 (2013).
102. Mingueneau, M. *et al.* The proline-rich sequence of CD3epsilon controls T cell antigen receptor expression on and signaling potency in preselection CD4+CD8+ thymocytes. *Nature immunology* **9**, 522-532 (2008).
103. Hassan, S.W. *et al.* Increased susceptibility to dextran sulfate sodium induced colitis in the T cell protein tyrosine phosphatase heterozygous mouse. *PLoS One* **5**, e8868 (2010).
104. Itohara, S. *et al.* T cell receptor delta gene mutant mice: independent generation of alpha beta T cells and programmed rearrangements of gamma delta TCR genes. *Cell* **72**, 337-348 (1993).
105. Schmitt, T.M. & Zuniga-Pflucker, J.C. Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 in vitro. *Immunity* **17**, 749-756 (2002).
106. Liehl, P. *et al.* Host-cell sensors for Plasmodium activate innate immunity against liver-stage infection. *Nat Med* **20**, 47-53 (2014).
107. Huber, W. *et al.* Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. *Nat Methods* **12**, 115-121 (2015).
108. Ribot, J.C. *et al.* Cutting edge: adaptive versus innate receptor signals selectively control the pool sizes of murine IFN-gamma- or IL-17-producing gammadelta T cells upon infection. *J Immunol* **185**, 6421-6425 (2010).
109. Dave, V.P. *et al.* Altered functional responsiveness of thymocyte subsets from CD3delta-deficient mice to TCR-CD3 engagement. *Int Immunol* **10**, 1481-1490 (1998).
110. Kim, S.T. *et al.* Distinctive CD3 heterodimeric ectodomain topologies maximize antigen-triggered activation of alpha beta T cell receptors. *J Immunol* **185**, 2951-2959 (2010).
111. Stritesky, G.L., Jameson, S.C. & Hogquist, K.A. Selection of self-reactive T cells in the thymus. *Annu Rev Immunol* **30**, 95-114 (2012).
112. Hayes, S.M. & Love, P.E. Distinct structure and signaling potential of the gamma delta TCR complex. *Immunity* **16**, 827-838 (2002).

113. Coffey, F. *et al.* The TCR ligand-inducible expression of CD73 marks gammadelta lineage commitment and a metastable intermediate in effector specification. *The Journal of experimental medicine* **211**, 329-343 (2014).
114. Azzam, H.S. *et al.* CD5 expression is developmentally regulated by T cell receptor (TCR) signals and TCR avidity. *The Journal of experimental medicine* **188**, 2301-2311 (1998).
115. Smith, K. *et al.* Sensory adaptation in naive peripheral CD4 T cells. *J Exp Med* **194**, 1253-1261 (2001).
116. Bluestone, J.A., Cron, R.Q., Cotterman, M., Houlden, B.A. & Matis, L.A. Structure and specificity of T cell receptor gamma/delta on major histocompatibility complex antigen-specific CD3+, CD4-, CD8- T lymphocytes. *J Exp Med* **168**, 1899-1916 (1988).
117. Ito, K. *et al.* Recognition of the product of a novel MHC TL region gene (27b) by a mouse gamma delta T cell receptor. *Cell* **62**, 549-561 (1990).
118. Schmolka, N., Wencker, M., Hayday, A.C. & Silva-Santos, B. Epigenetic and transcriptional regulation of gammadelta T cell differentiation: Programming cells for responses in time and space. *Seminars in immunology* **27**, 19-25 (2015).
119. Kannan, Y. *et al.* IkappaBzeta augments IL-12- and IL-18-mediated IFN-gamma production in human NK cells. *Blood* **117**, 2855-2863 (2011).
120. Turchinovich, G. & Pennington, D.J. T cell receptor signalling in gammadelta cell development: strength isn't everything. *Trends Immunol* **32**, 567-573 (2011).
121. Hayes, S.M. *et al.* Activation-induced modification in the CD3 complex of the gammadelta T cell receptor. *J Exp Med* **196**, 1355-1361 (2002).
122. Kreslavsky, T. *et al.* TCR-inducible PLZF transcription factor required for innate phenotype of a subset of gammadelta T cells with restricted TCR diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 12453-12458 (2009).
123. Carlyle, J.R. & Zuniga-Pflucker, J.C. Regulation of NK1.1 expression during lineage commitment of progenitor thymocytes. *J Immunol* **161**, 6544-6551 (1998).
124. Alonzo, E.S. *et al.* Development of promyelocytic zinc finger and ThPOK-expressing innate gamma delta T cells is controlled by strength of TCR signaling and Id3. *J Immunol* **184**, 1268-1279 (2010).
125. Lu, Y., Cao, X., Zhang, X. & Kovalovsky, D. PLZF Controls the Development of Fetal-Derived IL-17+Vgamma6+ gammadelta T Cells. *J Immunol* **195**, 4273-4281 (2015).
126. Pereira, P. & Boucontet, L. Innate NKTgammadelta and NKTalpha beta cells exert similar functions and compete for a thymic niche. *Eur J Immunol* **42**, 1272-1281 (2012).
127. Godfrey, D.I. & Berzins, S.P. Control points in NKT-cell development. *Nat Rev Immunol* **7**, 505-518 (2007).
128. Kreslavsky, T., Garbe, A.I., Krueger, A. & von Boehmer, H. T cell receptor-instructed alphabeta versus gammadelta lineage commitment revealed by single-cell analysis. *J Exp Med* **205**, 1173-1186 (2008).

129. Chien, Y.H., Zeng, X. & Prinz, I. The natural and the inducible: interleukin (IL)-17-producing gammadelta T cells. *Trends Immunol* **34**, 151-154 (2013).
130. Paget, C. *et al.* CD3bright signals on gammadelta T cells identify IL-17A-producing Vgamma6Vdelta1+ T cells. *Immunol Cell Biol* **93**, 198-212 (2015).
131. Michel, M.L. *et al.* Interleukin 7 (IL-7) selectively promotes mouse and human IL-17-producing gammadelta cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 17549-17554 (2012).
132. Roark, C.L. *et al.* Exacerbation of collagen-induced arthritis by oligoclonal, IL-17-producing gamma delta T cells. *J Immunol* **179**, 5576-5583 (2007).
133. Gil, D., Schamel, W.W., Montoya, M., Sanchez-Madrid, F. & Alarcon, B. Recruitment of Nck by CD3 epsilon reveals a ligand-induced conformational change essential for T cell receptor signaling and synapse formation. *Cell* **109**, 901-912 (2002).
134. Dopfer, E.P. *et al.* The CD3 conformational change in the gammadelta T cell receptor is not triggered by antigens but can be enforced to enhance tumor killing. *Cell Rep* **7**, 1704-1715 (2014).
135. Dave, V.P. Role of CD3epsilon-mediated signaling in T-cell development and function. *Crit Rev Immunol* **31**, 73-84 (2011).
136. Lee, S.Y. *et al.* Noncanonical mode of ERK action controls alternative alphabeta and gammadelta T cell lineage fates. *Immunity* **41**, 934-946 (2014).
137. Reine, J. *et al.* CD3gamma-independent pathways in TCR-mediated signaling in mature T and iNKT lymphocytes. *Cell Immunol* **271**, 62-66 (2011).
138. He, W. *et al.* Naturally activated V gamma 4 gamma delta T cells play a protective role in tumor immunity through expression of eomesodermin. *J Immunol* **185**, 126-133 (2010).
139. Silva-Santos, B., Pennington, D.J. & Hayday, A.C. Lymphotoxin-mediated regulation of gammadelta cell differentiation by alphabeta T cell progenitors. *Science* **307**, 925-928 (2005).
140. Seiler, M.P. *et al.* Elevated and sustained expression of the transcription factors Egr1 and Egr2 controls NKT lineage differentiation in response to TCR signaling. *Nat Immunol* **13**, 264-271 (2012).
141. Kappes, D.J. Expanding roles for ThPOK in thymic development. *Immunol Rev* **238**, 182-194 (2010).

ANEXOS



PUBLICACIONES RELEVANTES

Muñoz-Ruiz et al. *BMC Immunology* 2013, **14**:3
http://www.biomedcentral.com/1471-2172/14/3



RESEARCH ARTICLE

Open Access

Human CD3 γ , but not CD3 δ , haploinsufficiency differentially impairs $\gamma\delta$ versus $\alpha\beta$ surface TCR expression

Miguel Muñoz-Ruiz^{1,2†}, Verónica Pérez-Flores^{1†}, Beatriz Garcillán^{1,2}, Alberto C. Guardo¹, Marina S. Mazariegos^{1,2}, Hidetoshi Takada³, Luis M. Allende⁴, Sara S. Kilic⁵, Ozden Sanal⁶, Chaim M. Roifman⁷, Eduardo López-Granados⁸, María J. Recio^{1,2}, Eduardo Martínez-Naves¹, Edgar Fernández-Malavé^{1,2} and José R. Regueiro^{1,2*}

Abstract

Background: The T cell antigen receptors (TCR) of $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T lymphocytes are believed to assemble in a similar fashion in humans. Firstly, $\alpha\beta$ or $\gamma\delta$ TCR chains incorporate a CD3 $\delta\epsilon$ dimer, then a CD3 $\gamma\epsilon$ dimer and finally a $\zeta\zeta$ homodimer, resulting in TCR complexes with the same CD3 dimer stoichiometry. Partial reduction in the expression of the highly homologous CD3 γ and CD3 δ proteins would thus be expected to have a similar impact in the assembly and surface expression of both TCR isotypes. To test this hypothesis, we compared the surface TCR expression of primary $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells from healthy donors carrying a single null or leaky mutation in CD3G ($\gamma^{+/-}$) or CD3D ($\delta^{+/-}$, $\delta^{+/\text{leaky}}$) with that of normal controls.

Results: Although the partial reduction in the intracellular availability of CD3 γ or CD3 δ proteins was comparable as a consequence of the mutations, surface TCR expression measured with anti-CD3 ϵ antibodies was significantly more decreased in $\gamma\delta$ than in $\alpha\beta$ T lymphocytes in CD3 $\gamma^{+/-}$ individuals, whereas CD3 $\delta^{+/-}$ and CD3 $\delta^{+/\text{leaky}}$ donors showed a similar decrease of surface TCR in both T cell lineages. Therefore, surface $\gamma\delta$ TCR expression was more dependent on available CD3 γ than surface $\alpha\beta$ TCR expression.

Conclusions: The results support the existence of differential structural constraints in the two human TCR isotypes regarding the incorporation of CD3 $\gamma\epsilon$ and CD3 $\delta\epsilon$ dimers, as revealed by their discordant surface expression behaviour when confronted with reduced amounts of CD3 γ , but not of the homologous CD3 δ chain. A modified version of the prevailing TCR assembly model is proposed to accommodate these new data.

Keywords: T cells, CD3, Haploinsufficiency

Background

The human T cell antigen receptors (TCR) of $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T lymphocytes are believed to assemble in a similar fashion [1]. First, variable $\alpha\beta$ or $\gamma\delta$ heterodimers bind to invariant CD3 $\delta\epsilon$ heterodimers, then to CD3 $\gamma\epsilon$ heterodimers and finally to CD247 (or TCR ζ) homodimers, resulting in surface TCR complexes with equal amounts of the two different, albeit highly homologous, CD3 heterodimers. In contrast, mouse $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ TCR differ

drastically in their stoichiometry, since the $\gamma\delta$ TCR does not incorporate any CD3 $\delta\epsilon$ dimers but, rather, two CD3 $\gamma\epsilon$ dimers [2]. This finding begs the question as to whether the human variable $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ chains show identical affinity for both CD3 heterodimers.

We reasoned that, if both the $\alpha\beta$ and the $\gamma\delta$ TCR isotypes use identical amounts of CD3 $\gamma\epsilon$ and CD3 $\delta\epsilon$, then decreased availability of CD3 γ or CD3 δ proteins, as observed in heterozygous carriers of mutations in CD3 genes [3], would be expected to have a similar impact on the assembly and surface expression of both $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ TCR isotypes. To test this hypothesis, we compared TCR surface levels of primary $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells from healthy haploinsufficient donors carrying null or leaky

* Correspondence: regueiro@med.ucm.es

†Equal contributors

¹Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid 28040, Spain

²12 de Octubre Institute of Health Research, Madrid, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



© 2013 Muñoz-Ruiz et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

mutations in *CD3G* ($\gamma^{+/-}$) or *CD3D* ($\delta^{+/-}$, $\delta^{+/leaky}$). The results did not support the hypothesis of a similar impact on both TCR isotypes, but rather suggested a differential CD3 γ and CD3 δ usage scheme for each TCR isotype.

Results

Reduced surface $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ TCR expression in CD3 $\gamma^{+/-}$, CD3 $\delta^{+/-}$ or CD3 $\delta^{+/leaky}$ human T lymphocytes

CD3G ($\gamma^{+/-}$) or *CD3D* ($\delta^{+/-}$) haploinsufficient donors were uniformly healthy and showed abundant peripheral blood T lymphocytes with an essentially normal phenotype (Table 1). However, total T cell numbers were consistently lower than controls (Figure 1A) which correlated with a partial impairment of lymphocyte function (Table 1).

We have previously observed in $\gamma^{+/-}$ individuals that CD3 expression levels are overestimated when T cells are defined using antibodies against TCR-associated epitopes [7], such as BMA031 (for TCR $\alpha\beta$) or Immu510 (for TCR $\gamma\delta$). To avoid a similar bias in haploinsufficient donors, TCR-independent electronic gates were first

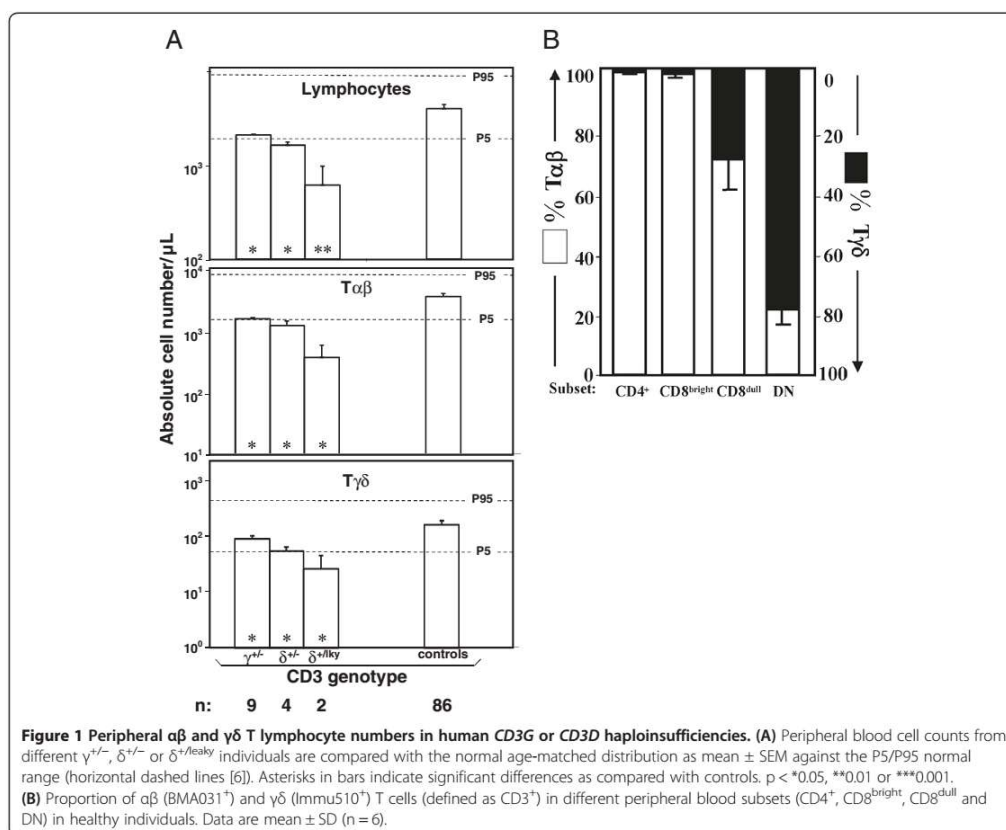
defined in order to identify $\alpha\beta$ or $\gamma\delta$ T cell subsets (Figure 1B). The results indicated that CD3 $^{+}$ cells within CD4 $^{+}$ or CD8 bright lymphocytes were >98% $\alpha\beta$ T cells, whereas CD3 $^{+}$ double negative (DN) lymphocytes were $78 \pm 6\%$ $\gamma\delta$ T cells. Accordingly, $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells were gated as CD4 $^{+}$ /CD8 bright and DN cells, respectively, for further analyses. Using several CD3-specific antibodies, analysis of surface TCR expression consistently showed reduced antibody binding in $\gamma^{+/-}$ and $\delta^{+/-}$ T lymphocytes as compared to normal controls (50-90% as judged by their relative mean fluorescence intensity, Figure 2A, B). These results were confirmed in family members of two newly reported patients with a leaky mutation in *CD3D* (termed $\delta^{+/leaky}$) [8]. Consistent with their relatively higher CD3 δ content as compared to $\delta^{+/-}$ donors, $\delta^{+/leaky}$ donors showed a milder, but nevertheless clear decrease in surface TCR expression (Figure 2A, B). In order to establish if these results were associated with reduced availability of each CD3 chain, we measured intracellular CD3 γ (iCD3 γ) or CD3 δ (iCD3 δ) by flow cytometry in haploinsufficient $\gamma^{+/-}$ and $\delta^{+/leaky}$ donors.

Table 1 Lymphocyte studies in haploinsufficient individuals^a

CD3 GENOTYPE	$\gamma^{+/-}$	$\delta^{+/-}$	$\delta^{+/leaky}$	Normal adults
Number of subjects	4	2	2	12
Ages	46 \pm 10	44	33 \pm 1	37 \pm 12
LYMPHOCYTE IMMUNOPHENOTYPE (%)				Mean (range)
T (CD3 $^{+}$)	60 \pm 6	66 \pm 1	62 \pm 5	71 (54-77)
T (CD3 $^{+}$ CD4 $^{+}$)	45 \pm 4	39 \pm 5	26 \pm 1	43 (30-53)
T (CD3 $^{+}$ CD8 $^{+}$)	18 \pm 1	26 \pm 6	16 \pm 7	32 (16-39)
B (CD19 $^{+}$)	18 \pm 5	12 \pm 2	ND	12 (6-19)
NK (CD3 $^{-}$ CD16 $^{+}$ /CD56 $^{+}$)	17 \pm 3	17 \pm 2	9 \pm 6	15 (8-31)
LYMPHOCYTE FUNCTION				
T cell proliferation (% of control max) ^b				Normal control
Medium	3 \pm 1	1	8 \pm 2	4 \pm 3
Anti-CD3 (UCHT-1)	74 \pm 4	ND	84 \pm 6	100
Phytohemagglutinin (PHA)	61 \pm 5	60 \pm 4	ND	100
Serum Ig (mg/dl)		ND	ND	Mean (range)
IgG	790 \pm 319			1158 (644-1436)
IgA	306 \pm 54			200 (65-348)
IgM	47 \pm 29			99 (55-206)
IgG1	611 \pm 37			840 (380-1000)
IgG2	165 \pm 222			240 (90-500)
IgG3	30 \pm 6			80 (15-150)
IgG4	9 \pm 6			40 (3-210)
NK cell cytotoxicity (% lysis)	52 \pm 6	80 \pm 5	ND	31 (21-41)

^aMean \pm SD of the indicated number of different subjects. When available, multiple values from single donors were included as single means in the calculations. Data obtained from several sources, including published material [4,5].

^bPercentage proliferation (^3H -thymidine uptake for $\gamma^{+/-}$ and $\delta^{+/-}$ donors, CFSE dilution for $\delta^{+/leaky}$ donors) referred to the maximum response of a healthy control in each experiment.



The results showed that this was indeed the case (Figure 2C), confirming previous reports of decreased *CD3 γ* protein in haploinsufficient donors [3].

Serial dilutions of *CD3* mAb further confirmed the findings above (Figure 2D), since the reduced binding to $\gamma^{+/-}$ T cells persisted in saturation conditions, but it was gradually lost near the endpoint, supporting the existence of less *CD3* binding sites [9].

From these results we conclude that human *CD3G* or *D* haploinsufficient donors show reduced binding of *CD3*-specific mAb to the TCR of their $\gamma\delta$ and $\alpha\beta$ T cells.

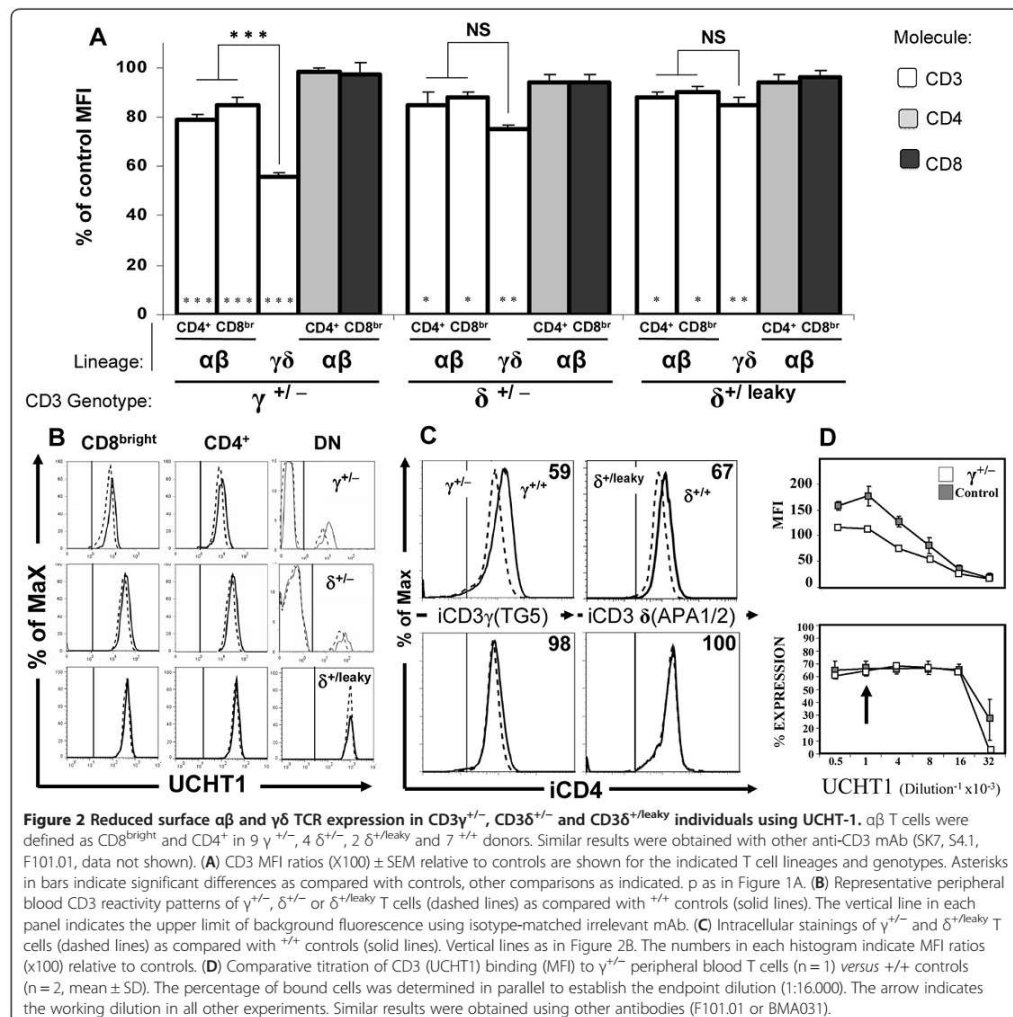
Discordant reduction of surface $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ TCR expression in *CD3 $\gamma^{+/-}$* but not *CD3 $\delta^{+/-}$* or *CD3 $\delta^{+/-leaky}$* human T lymphocytes

Analysis of *CD3* mAb surface binding to $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells with the different *CD3G* and *CD3D* genotypes, relative to normal controls, revealed that binding of *CD3* mAb to $\gamma^{+/-}$ $\gamma\delta$ T cells was unexpectedly poor ($55 \pm 3\%$) as compared with $\gamma^{+/-}$ $\alpha\beta$ T cells ($82 \pm 8\%$, Figure 2A).

This discordant reduction was specific for $\gamma^{+/-}$ donors, as it was not observed in $\delta^{+/-}$ or $\delta^{+/-leaky}$ donors. Further support for this discordant reduction was provided by the $\gamma\delta$ versus $\alpha\beta$ *CD3* expression ratio, which is normally 1.9 ± 0.22 [10,11] but becomes significantly less in $\gamma^{+/-}$ donors only (Figure 3). Taken together, these results indicate that normal surface $\gamma\delta$ TCR expression in humans is more critically dependent on the relative availability of *CD3 γ* , but not *CD3 δ* , than that of the $\alpha\beta$ TCR.

Discussion

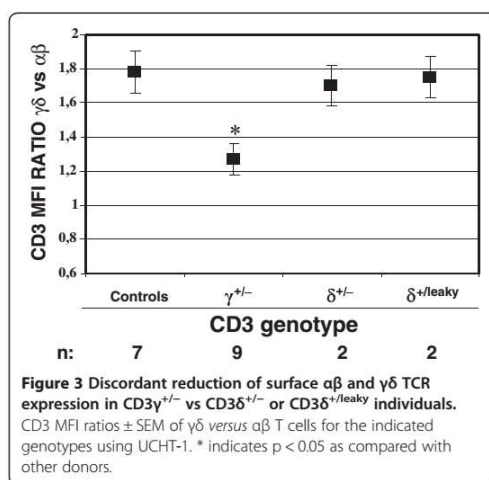
Human and mouse TCR complexes are assembled into octamers following common cues provided by transmembrane ionizable aminoacids in each dimer, with *CD3 $\gamma\epsilon$* and *CD3 $\delta\epsilon$* ectodomains contributing additional extracellular interactions for their ordered incorporation into the complex [12]. The extracellular interactions are quite specific, as the mouse $\gamma\delta$ TCR does not incorporate otherwise available *CD3 $\delta\epsilon$* dimers, but rather two



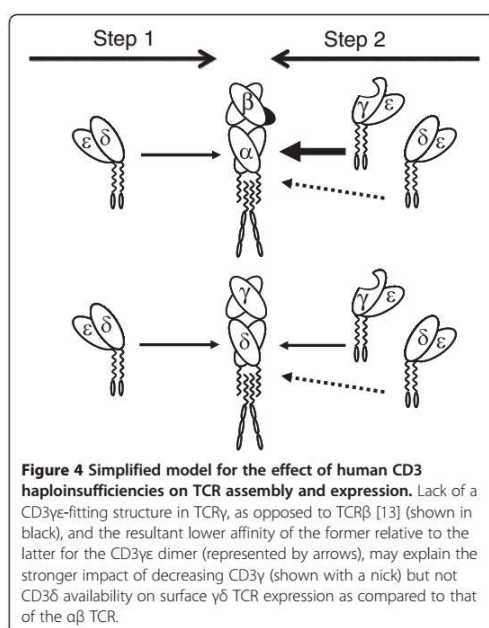
copies of the highly homologous $CD3\gamma\epsilon$ dimer. In sharp contrast, the human $\gamma\delta$ TCR incorporates both [2]. Mammalian $CD3\gamma$, but not $CD3\delta$, has a uniquely kinked ectodomain which fits into an asymmetrical loop in $TCR\beta$ for optimal $\alpha\beta$ TCR assembly and expression, and cannot be easily replaced by $CD3\delta$ due to steric hindrance, with functional consequences [13]. This likely leads to the conserved structural asymmetry shared by the human and mouse $\alpha\beta$ TCR. In contrast, $TCR\gamma$ lacks the asymmetrical loop of its $TCR\beta$ homologue and seems to allow a less stringent (i.e., with less affinity)

$CD3$ dimer usage in the $\gamma\delta$ TCR, which may explain its disparate stoichiometry in the two species.

The present study suggests that there must be differential structural constraints for the building and stable expression of $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ TCR complexes, as revealed by their discordant behaviour in cell surface expression when confronted with reduced availability of $CD3\gamma$, but not of $CD3\delta$ (Figures 2 and 3). Our findings are in agreement with available information about the assembly of human surface $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ TCR [12], as explained above and as proposed in Figure 4. In the model, $CD3\delta\epsilon$



dimers show a similar affinity for the human TCRα and TCRδ chains (step 1), thus reduced CD3δ expression has a similar impact on both. In contrast, when CD3γ is limiting, lack of a CD3γε-fitting structure in TCRγ, as opposed to TCRβ [13], may result in a lower affinity of the former relative to the latter for CD3γε. This may favour the incorporation of competing CD3δ dimers to nascent γδ TCR complexes (step 2), and would



ultimately lead to γδ TCR receptors devoid of the required stability for optimal surface expression. Moreover, human TCRδ (but not TCRα) can stably recruit not only CD3δε but also CD3γε [14] during step1, which may reduce further the availability of CD3γε dimers for step2 when CD3γ is limiting (not shown).

Further studies are required to demonstrate a direct link between CD3γ or δ availability and TCR assembly and surface expression. However, the paucity of CD3 haploinsufficient individuals might hamper these studies in humans. A flow cytometry-based approach as illustrated in Figure 2B could help to identify such individuals.

Lastly, since carriers of CD3G or CD3D mutations showed affected TCR expression (Figure 2) and T-cell selection (Figure 1), which seemed in turn to impair to some extent T-cell function (Table 1) [15] the question of whether they also have increased risk of immunological dysfunction deserves further investigation.

Conclusions

The results indicate that the dimer assembly scheme of the human TCR complex is different in αβ versus γδ T cells, as revealed by their discordant behaviour when confronted with limiting amounts of CD3γ, but not of the homologous CD3δ chain. The novel data allow proposing a modified version of the prevailing TCR assembly model.

Methods

Cells

After obtaining informed consent following IRB authorization (Ethics Committee for Clinical Investigation of Clínico San Carlos Hospital, Madrid), we studied nine healthy heterozygous carriers of mutations in CD3γ (γ^{+/-}) [3,7] of Spanish or Turkish descent and six healthy heterozygous carriers of mutations in CD3δ (δ^{+/-}, δ^{+leaky}) [8,16,17] of Japanese, Mennonite or Colombian descent. Normal donors (termed^{+/+}) were used as controls. Their lymphocyte immunophenotype and functional features are summarized in Table 1. PBL were isolated by Ficoll-Hypaque (GE Healthcare) gradients and resuspended in RPMI 1640 medium (Gibco) supplemented with 10% FCS (PAA Laboratories), 1% L-glutamine and antibiotics-antymitotic (100 units/ml of penicillin G, 100 μg/ml of streptomycin sulfate, and 0.25 μg/ml of amphotericin B) from Gibco.

Antibodies and flow cytometry

The expression of different surface markers was studied by flow cytometry using standard procedures in fresh whole blood or isolated PBL [18]. For intracellular stainings cells were fixed and permeabilized as previously reported [19].

The following anti-human mAb were used: anti-CD3 ϵ (S4.1) from Caltag Laboratories (now Invitrogen), anti-CD3 $\epsilon\gamma/\epsilon\delta$ (UCHT-1), anti-TCR $\alpha\beta$ (BMA031), and anti-TCR $\gamma\delta$ (Immu510) from Beckman Coulter, anti-CD3 ϵ (SK7), anti-CD4 (Leu2a), anti-CD8 (Leu3a), anti-TCR $\gamma\delta$ (11F2), and anti-CD8 (SK1) from BD Biosciences. Anti-CD3 $\epsilon\gamma/\epsilon\delta$ (F101.01) hybridoma supernatant and anti-CD3 δ (APA1/2) ascitic fluid were a generous gift from Dr. B. Rubin (CHU de Purpan, France). TG5 (an anti-CD3 γ rabbit antiserum raised against the CD3 γ C-terminal peptide GLQGNQLRRN) was kindly provided by D. Alexander (Babraham Institute, U.K.). The mAb were FITC-, PE-Cy5 or PE-conjugated, or purified, and for the latter a PE-conjugated goat anti-mouse IgG (H + L) or anti-rabbit (H + L) from Caltag Laboratories was used as a secondary reagent. Background fluorescence was defined with an isotype-matched irrelevant mAb from Caltag Laboratories. For comparative stainings we used the mean fluorescence intensity (MFI), defined as the average fluorescence value of the corresponding mAb referred to the logarithmic scale of fluorescence intensity along the x-axis of the histograms. Data were analyzed with FlowJo software (TreeStar).

Proliferative assays

1 $\times 10^5$ PBLs were placed in round-bottom microtitre wells and stimulated with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anti-human CD3 (UCHT-1) or 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PHA. After 3 days of *in vitro* culture, wells were individually pulsed with 1 μCi of ^3H -TdR (Amersham, Buckinghamshire, U.K.) for another 16 to 18 h and harvested onto glass fiber filters. Thymidine incorporation into cellular DNA was evaluated as cpm in a scintillation β counter (Packard, Meriden, CT).

For CFSE (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) dilution experiments, cells were labeled with 1 μM CFSE in PBS for 10 min at 37°C at day 0, washed twice in cold PBS, plated and stimulated as above. CFSE dilution was subsequently determined by flow cytometry within CD3 $^+$ lymphocytes.

Cytotoxicity assays

Cytotoxicity was measured using the nonradioactive Cytotoxicity Detection kit LDH (Roche). Cells were cocultured in a 96 V-well plates for 4 h at 25: 1 (Effector: Target) ratios and the percentage of specific lysis was determined from the amount of lactate dehydrogenase activity detected in culture supernatants.

Statistical analysis

Student's *t*-tests were performed using SPSS 11.5.1 statistical program software (Chicago, IL). Only *p* values below 0.05 were considered significant. Data are

presented as mean \pm SEM (standard error of the mean) or \pm SD (standard deviation).

Abbreviations

PBL: Peripheral blood lymphocytes; MFI: Mean fluorescence intensity; TCR: T cell antigen receptor; FCS: Fetal calf serum; ND: Not done; NS: Not significant.

Competing interest

The authors declare no conflict of interest.

Authors' contributions

VP-F, ACG, BG, MM-R and HT carried out the analysis of TCR expression and function in human T lymphocytes MM-R, BG and MM-L performed titration studies and drafted the manuscript. LMA, SSK, OS, EL-G and CMF provided lymphocytes samples and leucocyte counts. MJR, EM-N, and EF-M provided technical knowledge and supervision. JRR planned the study and provided funds. JRR and EF-M wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Authors' information

E. Fernández-Malavé and J.R. Regueiro are joint senior authors.

Acknowledgements

Bent Rubin provided continuous support and comments. Elena M. Busto, Joaquín Caspistegui, Juana Gil, Miguel Fdez-Arquero and Jesús Reiné provided technical help. Brenda Reid, Sandra Mendonca and Linda Pires from the Hospital for Sick Children in Toronto are gratefully acknowledged for their excellent collaboration to obtain and ship blood samples. This work was supported by grants from the Ministerio de Educación (BFU2005-01738/BMC and SAF2011-24235), Comunidad Autónoma de Madrid (CAM) (GR/SAL/0570/2004 and S2011/BMD-2316), Fundación Laín, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII PI080921, PI060057 and RIER RD08-0075-0002) and the Hospital 12 de Octubre Health Research Institute. MMR was supported by the Universidad Complutense de Madrid and ISCIII and VPF was supported by Ministerio de Educación.

Author details

¹Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid 28040, Spain. ²12 de Octubre Institute of Health Research, Madrid, Spain. ³Department of Pediatrics, Kyushu University, Higashi-ku, Fukuoka, Japan. ⁴Inmunología, Hospital 12 de Octubre, Madrid 28041, Spain. ⁵Pediatric Immunology, Uludağ University, Görükle-Bursa, Turkey. ⁶Immunology Division, Hacettepe University, Children's Hospital, Ankara, Turkey. ⁷Immunology and Allergy, Hospital for Sick Children, University of Toronto, Toronto, Canada. ⁸La Paz University Hospital, Madrid, Spain.

Received: 21 September 2012 Accepted: 16 January 2013

Published: 21 January 2013

References

1. Call ME, Pyrdol J, Wiedmann M, Wucherpfennig KW: The organizing principle in the formation of the T cell receptor-CD3 complex. *Cell* 2002, **111**(7):967-79.
2. Siegers GM, Swamy M, Fernández-Malavé E, Minguet S, Rathmann S, Guardo AC, et al: Different composition of the human and the mouse gamma delta T cell receptor explains different phenotypes of CD3gamma and CD3delta immunodeficiencies. *J Exp Med* 2007, **204**(11):2537-44.
3. Thomassen EA, Dekking EH, Thompson A, Franken KL, Sanal O, Abrahams JP, et al: The impact of single amino acid substitutions in CD3gamma on the CD3epsilon/gamma interaction and T-cell receptor-CD3 complex formation. *Hum Immunol* 2006, **67**(8):579-88.
4. Regueiro JR, López-Botet M, De Landazuri MO, Alcamí J, Corell A, Martín Villa JM, Vicario JL, Arnaiz-Villena A: An *in vivo* functional immune system lacking polyclonal T-cell surface expression of the CD3/Ti(WT31) complex. *Scand J Immunol* 1987, **26**(6):699-708.
5. Perez-Aciego P: Caracterización clínica, inmunológica y molecular de una inmunodeficiencia familiar por defecto de expresión del receptor para antígeno del linfocito T, PhD thesis. 12 de Octubre Hospital, Madrid, Immunology Department. 1992.

6. Comans-Bitter WM, de Groot R, van den Beemd R, Neijens HJ, Hop WC, Groeneveld K, et al: Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood. Reference values for lymphocyte subpopulations. *J Pediatr* 1997, **130**(3):388–93.
7. Recio MJ, Moreno-Pelayo MA, Kiliç SS, Guardo AC, Sanal O, Allende LM, et al: Differential biological role of CD3 chains revealed by human immunodeficiencies. *J Immunol* 2007, **178**(4):2556–64.
8. Gil J, Busto EM, Garcillán B, Chean C, García-Rodríguez MC, Díaz-Alderete A, et al: A leaky mutation in CD3D differentially affects $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells and leads to a T $\alpha\beta$ -T $\gamma\delta$ + B + NK + human SCID. *J Clin Invest* 2011, **121**(10):3872–6.
9. Geuijen CA, Clijsters-van der Horst M, Cox F, Rood PM, Throsby M, Jongeneelen MA, et al: Affinity ranking of antibodies using flow cytometry: application in antibody phage display-based target discovery. *J Immunol Methods* 2005, **302**(1–2):68–77.
10. Thibault G, Bardos P: Compared TCR and CD3 epsilon expression on alpha beta and gamma delta T cells. Evidence for the association of two TCR heterodimers with three CD3 epsilon chains in the TCR/CD3 complex. *J Immunol* 1995, **154**(8):3814–20.
11. Nicolas L, Monneret G, Debard AL, Blesius A, Gutowski MC, Salles G, et al: Human gammadelta T cells express a higher TCR/CD3 complex density than alphabeta T cells. *Clin Immunol* 2001, **98**(3):358–63.
12. Wucherpfennig KW, Gagnon E, Call MJ, Huseby ES, Call ME: Structural biology of the T-cell receptor: insights into receptor assembly, ligand recognition, and initiation of signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010, **2**(4):a005140.
13. Kim ST, Touma M, Takeuchi K, Sun ZY, Dave VP, Kappes DJ, et al: Distinctive CD3 heterodimeric ectodomain topologies maximize antigen-triggered activation of alpha beta T cell receptors. *J Immunol* 2010, **185**(5):2951–9.
14. Alibaud L, Arnaud J, Llobera R, Rubin B: On the role of CD3delta chains in TCRgammadelta/CD3 complexes during assembly and membrane expression. *Scand J Immunol* 2001, **54**(1–2):155–62.
15. Labrecque N, Whitfield LS, Obst R, Waltzinger C, Benoist C, Mathis D: How much TCR does a T cell need? *Immunity* 2001, **15**(1):71–82.
16. Takada H, Nomura A, Roifman CM, Hara T: Severe combined immunodeficiency caused by a splicing abnormality of the CD3delta gene. *Eur J Pediatr* 2005, **164**(5):311–4.
17. Dadi HK, Simon AJ, Roifman CM: Effect of CD3delta deficiency on maturation of alpha/beta and gamma/delta T-cell lineages in severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 2003, **349**(19):1821–8.
18. Alvarez-Zapata D, de Miguel OS, Fontán G, Ferreira A, García-Rodríguez MC, Madero L, et al: Phenotypal and functional characterization of herpesvirus saimiri-immortalized human major histocompatibility complex class II-deficient T lymphocytes. *Tissue Antigens* 1998, **51**(3):250–7.
19. Pacheco-Castro A, Alvarez-Zapata D, Serrano-Torres P, Regueiro JR: Signaling through a CD3 gamma-deficient TCR/CD3 complex in immortalized mature CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *J Immunol* 1998, **161**(6):3152–60.

doi:10.1186/1471-2172-14-3

Cite this article as: Muñoz-Ruiz et al.: Human CD3 γ , but not CD3 δ , haploinsufficiency differentially impairs $\gamma\delta$ versus $\alpha\beta$ surface TCR expression. *BMC Immunology* 2013 **14**:3.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



TCR signal strength controls thymic differentiation of discrete proinflammatory $\gamma\delta$ T cell subsets

Miguel Muñoz-Ruiz^{1,2}, Julie C Ribot², Ana R Grosso², Natacha Gonçalves-Sousa², Ana Pamplona², Daniel J Pennington³, José R Regueiro¹, Edgar Fernández-Malavé^{1,4} & Bruno Silva-Santos^{2,4}

The mouse thymus produces discrete $\gamma\delta$ T cell subsets that make either interferon- γ (IFN- γ) or interleukin 17 (IL-17), but the role of the T cell antigen receptor (TCR) in this developmental process remains controversial. Here we show that *Cd3g^{+/-} Cd3d^{+/-}* (CD3 double-haploinsufficient (CD3DH)) mice have reduced TCR expression and signaling strength on $\gamma\delta$ T cells. CD3DH mice had normal numbers and phenotypes of $\alpha\beta$ thymocyte subsets, but impaired differentiation of fetal V γ 6⁺ (but not V γ 4⁺) IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells and a marked depletion of IFN- γ -producing CD122⁺ NK1.1⁺ $\gamma\delta$ T cells throughout ontogeny. Adult CD3DH mice showed reduced peripheral IFN- γ ⁺ $\gamma\delta$ T cells and were resistant to experimental cerebral malaria. Thus, TCR signal strength within specific thymic developmental windows is a major determinant of the generation of proinflammatory $\gamma\delta$ T cell subsets and their impact on pathophysiology.

Proinflammatory cytokines orchestrate protective immune responses to pathogens and tumors but are also responsible for tissue-damaging inflammation and autoimmunity. Among various cellular sources, $\gamma\delta$ T cells have emerged as major producers of IFN- γ and/or IL-17 in several diseases. On one hand, IFN- γ production by $\gamma\delta$ T cells underlies protective responses to infections¹, as well as tumor immunity², but it is also associated with susceptibility to severe malaria³. On the other hand, IL-17 secretion by $\gamma\delta$ T cells is a key defense mechanism against various bacterial infections, such as *Staphylococcus aureus*⁴ or *Listeria monocytogenes*^{4,5}, but is also a critical component of inflammatory and autoimmune syndromes such as psoriasis^{6–8}, colitis⁹, chronic granulomatous disease¹⁰, ischemic brain inflammation¹¹ and experimental autoimmune encephalomyelitis^{12–14}.

The nonredundant roles of IFN- γ -producing (IFN- γ ⁺) and IL-17⁺ $\gamma\delta$ T cells are tightly linked to “developmental preprogramming” in the mouse thymus¹⁵. Whereas conventional effector CD4⁺ T cells differentiate in peripheral lymphoid organs in response to antigen and additional environmental cues, $\gamma\delta$ T cells complete their functional maturation in the thymus. The mouse, which generates discrete populations of IFN- γ ⁺ and IL-17⁺ $\gamma\delta$ T cells that can be identified on the basis of CD27 and CCR6 expression^{12,16,17}. Importantly, these subpopulations have different functions; for example, CD27⁺ IL-17⁺ $\gamma\delta$ T cells promote tumor cell growth^{18,19}, whereas CD27⁺ IFN- γ ⁺ $\gamma\delta$ T cells inhibit it^{2,20}. It is therefore crucial to understand how distinct functional $\gamma\delta$ T cell subsets are generated and regulated.

Given its pivotal role in thymocyte development and selection, the TCR is a likely determinant of the functional differentiation of $\gamma\delta$ T cells¹⁵. It was shown that $\gamma\delta$ T cells specific for the major

histocompatibility (MHC) complex I molecules T10 and T22 (T10/T22), which account for ~0.4% of peripheral $\gamma\delta$ T cells, produce IL-17 and IFN- γ in the absence and presence, respectively, of thymic T10/T22 expression¹². Consistent with this, thymic selection drives dendritic epidermal T cells (DETCs) that populate the mouse epidermis toward IFN- γ but away from IL-17 production²¹. However, SKG mice, which are hypomorphic for the TCR signal-transducing kinase ZAP70 and retain only 10% of its signaling ability, show impaired development of IL-17⁺ $\gamma\delta$ T cells²². As such, the role of TCR signal ‘strength’ in the development of proinflammatory $\gamma\delta$ T cell subsets remains unclear.

TCR signal strength is known to control the earliest stage of $\gamma\delta$ T cell development, i.e., lineage commitment²³. The manipulation of signal transduction in TCR-transgenic T cells influences the $\gamma\delta$ versus $\alpha\beta$ thymocyte fate^{24,25}, with $\gamma\delta$ T cells requiring stronger TCR signaling than $\alpha\beta$ T cells to develop; however, the impact on subsequent maturation of $\gamma\delta$ T cells, particularly IFN- γ ⁺ versus IL-17⁺ $\gamma\delta$ T cells, was not assessed in these studies. Models based on a single transgenic TCR may not be ideal to answer this question, however, because $\gamma\delta$ T cell development is tightly linked to the dynamics of TCR rearrangements during ontogeny. Indeed, ‘developmental waves’ with distinct TCR gene usage populate different peripheral tissues, and distinct TCR γ chain variable region (V γ) repertoires can have substantial biases toward IFN- γ or IL-17 production^{16,26}. For example, of the two main $\gamma\delta$ T cell subsets in peripheral lymphoid organs, V γ 1⁺ T cells preferentially secrete IFN- γ , whereas V γ 4⁺ T cells are biased toward IL-17 (refs. 16,26). In addition, V γ 5⁺ T cells generated around embryonic days 15–16 (E15–E16) do not secrete IL-17, whereas this

¹Department of Immunology, School of Medicine, Complutense University, Madrid, Spain. ²Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Lisbon, Portugal. ³Blizard Institute, Barts and The London School of Medicine, Queen Mary University of London, London, UK. ⁴These authors contributed equally to this work. Correspondence should be addressed to B.S.-S. (bssantos@medicina.ulisboa.pt) or E.F.-M. (edfern@med.ucm.es).

Received 7 December 2015; accepted 1 March 2016; published online 4 April 2016; doi:10.1038/ni.3424

ARTICLES

cytokine is abundantly produced by $V\gamma 6^+$ T cells that differentiate at E17–E18. Moreover, in-depth transcriptional profiling of $\gamma\delta$ thymocyte subsets by the Immunological Genome Project (<http://www.immgen.org>) demonstrates a divergence between the transcriptional networks of IL-17-biased $V\gamma 6^+$ and $V\gamma 4^+$ T cells versus IFN- γ -biased $V\gamma 5^+$ and $V\gamma 1^+$ T cells^{27,28}.

The association between certain $\gamma\delta$ TCR repertoires and differential IFN- γ or IL-17 production²⁶ suggests that TCR signaling is a major determinant of the functional differentiation of $\gamma\delta$ T cells in the thymus. However, testing this hypothesis has been hampered by the lack of mouse models that specifically interfere with TCR $\gamma\delta$ signaling *in vivo*. Here we describe a selective defect in the surface expression of TCR $\gamma\delta$, but not TCR $\alpha\beta$, in $Cd3g^{+/-}$ $Cd3d^{+/-}$ (CD3DH) mice and show that reduced TCR $\gamma\delta$ signaling affects the differentiation of discrete subsets of IFN- γ and IL-17 $\gamma\delta$ T cells during thymic ontogeny, with pathological consequences.

RESULTS

CD3DH mice show reduced TCR signaling in $\gamma\delta$ T cells

During the screening of various lines of (single or double) haploinsufficient CD3 mutants, we observed that CD3DH mice had markedly lower cell surface expression of TCR $\gamma\delta$ and CD3 ϵ (Fig. 1a,b) than did wild-type mice, as well as low $\gamma\delta$ thymocyte numbers (Fig. 1c). This reduction was not observed in singly haploinsufficient ($Cd3d^{+/-}$ or $Cd3g^{+/-}$) mice (Supplementary Fig. 1a) and was more severe than that observed in CD3 δ -deficient ($Cd3d^{-/-}$) mice²⁹ (Supplementary Fig. 1b). The reduced numbers of $\gamma\delta$ thymocytes in CD3DH mice were not due to increased cell death (Supplementary Fig. 1c), which suggests that lower TCR $\gamma\delta$ expression impaired $\gamma\delta$ T cell development, as reported in transgenic models^{24,25}. CD3DH $\gamma\delta$ thymocytes remained mostly CD4⁺CD8⁺ (data not shown), thus excluding diversion into the $\alpha\beta$ lineage. However, TCR $\alpha\beta$ expression was not affected, and $\alpha\beta$ thymocyte development proceeded normally in CD3DH mice (Fig. 1d–f). Consistent with normal TCR $\alpha\beta$ signaling and selection, the generation of agonist-selected Foxp3⁺CD4⁺ and CD1d-restricted natural killer T (NKT) cells was similar to that in wild-type mice (Supplementary Fig. 1d,e).

To characterize the downstream effects of reduced TCR $\gamma\delta$ expression, we assessed the expression of the agonist selection markers CD73, a signature of TCR $\gamma\delta$ signaling during thymic development³⁰, and CD5, a stable indicator of TCR signal strength³¹, as well as the maturation markers CD122 and CD44 (refs. 12,15,17). All were markedly lower in $\gamma\delta$ thymocytes from CD3DH mice compared to those from wild-type mice (Fig. 1g). Upon TCR stimulation, the activation markers CD69 and CD25 were also decreased in peripheral (splenic) CD3DH $\gamma\delta$ T cells (Fig. 1h). Moreover, CD3DH $\gamma\delta$ T cells had lower TCR responsiveness, as assessed by activation of the kinases ERK (Fig. 1i) and AKT (Supplementary Fig. 2a) and calcium mobilization (Supplementary Fig. 2b), than wild-type $\gamma\delta$ T cells. These data indicate that lower surface TCR $\gamma\delta$ expression in CD3DH mice impairs signal transduction and downstream TCR-dependent processes.

To test whether the phenotype of $\gamma\delta$ T cells in CD3DH mice was cell intrinsic, we established mixed (1:1) bone marrow (BM) chimeras by transferring CD3DH (Thy-1.2) and wild-type (Thy-1.1) whole BM cells into either TCR δ -deficient or RAG2-deficient hosts. In both hosts we observed reduced TCR $\gamma\delta$ expression in CD3DH-derived $\gamma\delta$ thymocytes (Fig. 1j), which consistently accounted for a minor fraction of the total $\gamma\delta$ thymocyte pool, compared to wild-type $\gamma\delta$ thymocytes. In contrast, $\alpha\beta$ thymocytes were generated in similar numbers from CD3DH and wild-type precursors (Fig. 1k), indicating that CD3DH progenitors are outcompeted by wild-type precursors

for $\gamma\delta$ but not $\alpha\beta$ T cell development. Of note, this defect could be overcome with a 1:9 (wild-type/CD3DH) ratio (Supplementary Fig. 3), which indicates that CD3DH progenitors can generate $\gamma\delta$ thymocytes, albeit with lower potency than wild-type precursors. Thus, haploinsufficiency for both $Cd3d$ and $Cd3g$ results in lower TCR $\gamma\delta$ expression levels and signaling and reduced numbers of $\gamma\delta$ thymocytes.

Impaired differentiation of IL-17⁺ and IFN- γ ⁺ $\gamma\delta$ T cells

We next analyzed the functional differentiation of $\gamma\delta$ T cell subsets. Development of CD27⁺ and CD27[−] $\gamma\delta$ T cells was observed during the embryonic stages and continued into adulthood (Fig. 2a), as previously reported¹⁶. Both IFN- γ ⁺ and IL-17⁺ $\gamma\delta$ thymocytes were observed in lower frequencies in CD3DH than in wild-type E18 embryos (Fig. 2b,c). Whereas the reduction in IFN- γ ⁺ $\gamma\delta$ thymocytes was maintained after birth and into adulthood, the frequency of IL-17⁺ $\gamma\delta$ thymocytes in CD3DH mice normalized to wild-type levels between 1 and 6 weeks of age (Fig. 2b–d). This coincided with a switch in TCR V γ usage: most IL-17⁺ $\gamma\delta$ T cells were V $\gamma 1$ –V $\gamma 4$ ⁺ (validated as V $\gamma 6$ ⁺ by GL3 and 17D1 antibody staining)¹⁸ (data not shown) in E18 embryos and neonates and V $\gamma 4$ ⁺ from week 1 on (Fig. 2e). Of note, IL-17⁺V $\gamma 6$ ⁺ cells are generated exclusively during embryonic life³²; we found that only V $\gamma 6$ ⁺ (not V $\gamma 4$ ⁺) thymocytes showed reduced IL-17 production in CD3DH mice (Fig. 2f). These data suggest that the effector $\gamma\delta$ T cell subsets generated within distinct developmental windows, as marked by particular V γ usage, have distinct TCR signal strength requirements.

Transcriptional signatures of TCR signal strength in $\gamma\delta$ T cells

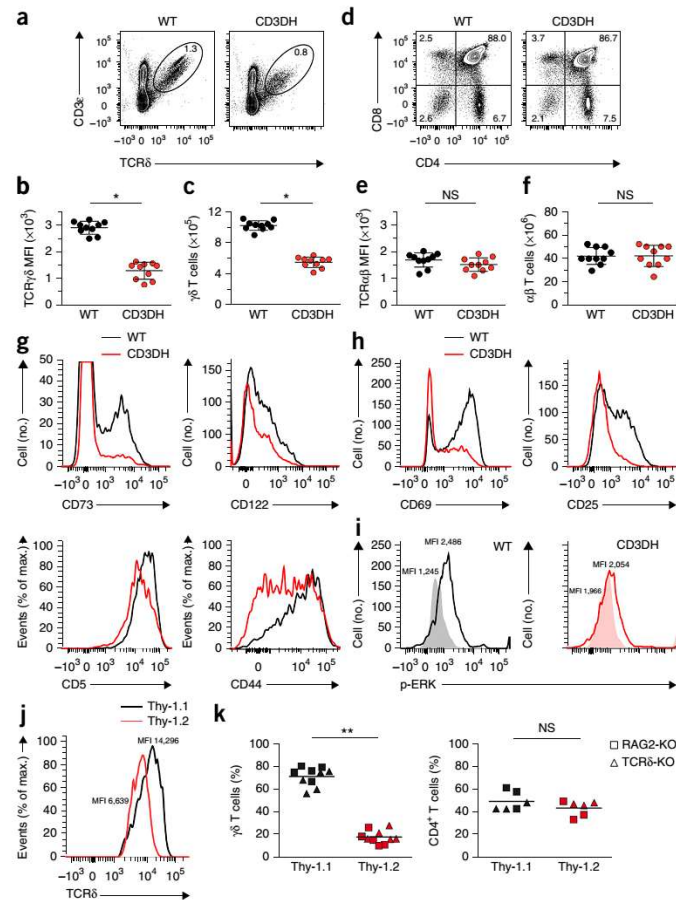
Because developmental programming of $\gamma\delta$ T cells is set at the transcriptional level^{27,33,34}, we performed transcriptome-wide analysis of sorted total $\gamma\delta$ thymocytes from CD3DH and wild-type E18 and 6-week-old mice. This analysis showed highly dynamic patterns of gene expression during ontogeny (Fig. 3a). Among the mRNAs upregulated in $\gamma\delta$ thymocytes from E18 to adult in wild-type mice, those linked to IFN- γ production were generally impaired in CD3DH $\gamma\delta$ thymocytes and included *Nr4a3*, *Nr4a2* and *Bcl2a1* (refs. 16,34,35); the transcription factors *Egr2*, *Egr3* and *Id3*, which are major suppressors of the IL-17 differentiation pathway²¹; and *Nfkbiz* (which encodes the transcription factor I κ B ζ)³⁶, *Tnfrsf18* (encoding GITR), *Lilr4b* (also known as *Gp49a*) and *Lilrb4a* (also known as *Lilrb4*, encoding Gp49b)³⁷ (Fig. 3a and Supplementary Fig. 4a).

Key genes involved in IL-17 production, such as *Il17a*, *Il17f* and *Il23r13.33*, which are highly expressed in fetal $\gamma\delta$ thymocytes and reduced in adult $\gamma\delta$ thymocytes in wild-type mice, were downregulated in CD3DH $\gamma\delta$ thymocytes (Fig. 3a). In both wild-type and CD3DH $\gamma\delta$ thymocytes, embryonically rearranged TCRs such as V $\gamma 5$ and V $\gamma 6$ were downregulated, as was the transcription factor PLZF (encoded by *Zbtb16*), which is characteristic of fetal $\gamma\delta$ thymocytes²⁷ (Fig. 3a).

The IL-17⁺ $\gamma\delta$ T cell signature genes *Sox4* and *Sox13* (refs. 27,28) were greatly reduced in embryonic V $\gamma 6$ ⁺ but not V $\gamma 4$ ⁺ CD3DH thymocytes (as compared to wild-type thymocytes) (Supplementary Fig. 4b), indicating that the IL-17⁺V $\gamma 6$ ⁺ and IL-17⁺V $\gamma 4$ ⁺ thymocyte subsets have distinct developmental TCR signal strength requirements. Of note, the expression of *Tbx21* (which encodes T-bet) and *Rorc* (which encodes ROR γ t), which transcriptionally regulate *Ifng* and *Il17a* expression, respectively, was not affected in CD3DH $\gamma\delta$ thymocytes (data not shown).

Next, for a TCR-mediated gain-of-function approach, we stimulated total $\gamma\delta$ thymocytes from adult CD3DH or wild-type mice with

Figure 1 $\gamma\delta$ T cells from CD3DH mice show reduced TCR $\gamma\delta$ expression and signaling. (a) Flow cytometry analysis of CD3 ϵ and TCR δ expression in thymocytes from 1-week-old wild-type (WT) or CD3DH mice ($n = 10$ mice per group). (b–f) TCR $\gamma\delta$ mean fluorescence intensity (MFI) (b) and $\gamma\delta$ thymocyte numbers (c), gated as in a; CD8 versus CD4 phenotypes of thymocytes ($n = 3$ adult mice per group of adult mice) (d), TCR $\alpha\beta$ MFI (e) and absolute numbers of TCR β +CD3+ thymocytes (f) from WT and CD3DH mice. (g) Expression of various agonist selection and maturation markers in gated TCR δ +CD3+CD27+ thymocytes. (h) CD69 and CD25 expression in sorted TCR δ +CD3+CD27+ spleen cells stimulated with plate-coated anti-CD3 ϵ for 24 h. (i) Analysis of phosphorylated Erk1 and Erk2 (p-ERK; open histograms) versus isotype-matched background staining (shaded histograms) in sorted TCR δ +CD3+CD27+ lymph node cells stimulated for 5 min with soluble anti-CD3 ϵ . Data in i are representative of three independent experiments. (j,k) Flow cytometry analysis of comparative TCR $\gamma\delta$ MFI (j) and Thy-1.1 (WT-derived) versus Thy-1.2 (CD3DH-derived) fractions among gated TCR δ +CD3+ and CD4+CD3+ thymocytes (k) from 1:1 mixed WT:CD3DH bone marrow chimeras. Each symbol represents one RAG2-knockout (RAG2-KO) or TCR δ -KO host. Numbers in outlined areas or quadrants of flow cytometry plots indicate percentages of cells in each. In b, c, e and f, points represent individual mice ($n = 10$), and error bars represent mean \pm s.d. NS, not significant; * $P < 0.01$ (Student's *t*-test).



saturation amounts of monoclonal anti-CD3 ϵ for 16 h to achieve crosslinking of all available TCR complexes on the cell surface. We observed an upregulation of *Egr2* and *Egr3* expression in wild-type $\gamma\delta$ thymocytes (Fig. 3b), consistent with their induction by strong TCR signals²¹. *Egr2* and *Egr3* upregulation was also observed in stimulated CD3DH $\gamma\delta$ thymocytes (Fig. 3b), which suggests that increasing $\gamma\delta$ TCR signaling can rescue the expression of IFN- γ -associated transcriptional signatures in CD3DH $\gamma\delta$ thymocytes. In addition, anti-CD3 ϵ stimulation downregulated IL-17+ $\gamma\delta$ T cell signature genes, such as *Sox4* (ref. 28), *Il23r* and *Il1r1* (refs. 13,33,38), in both wild-type and CD3DH $\gamma\delta$ thymocytes (Fig. 3b). Collectively, these data suggest that strong TCR signals are required to promote IFN- γ at the expense of IL-17 production by adult $\gamma\delta$ thymocytes.

CD3DH mice lack IFN- γ ^{hi}CD122⁺NK1.1⁺ $\gamma\delta$ thymocytes

We next tested whether the deficiency in IFN- γ expression in $\gamma\delta$ thymocytes from CD3DH mice involved the depletion of a specific $\gamma\delta$ T cell subset committed to IFN- γ production. Thus, we analyzed the expression of CD122 (ref. 12) and NK1.1 (refs. 17,30), two markers previously associated with IFN- γ ^{hi} $\gamma\delta$ T cells, on adult CD27+ $\gamma\delta$ T cells. We detected a CD122⁺NK1.1⁺ $\gamma\delta$ T cell population in the wild-type thymus that was absent in CD3DH mice (Fig. 4a,b). CD122⁺NK1.1⁺ $\gamma\delta$ T cells, probably precursors of CD122⁺NK1.1⁺ $\gamma\delta$ T cells, were also reduced in the CD3DH thymus compared to the wild-type thymus (Fig. 4a). The V γ repertoire changed from V γ 4-biased to V γ 1-enriched between the CD122⁺ and the more mature CD122⁺ $\gamma\delta$

T cells in wild-type thymi (Fig. 4c), which suggests that TCR selection shapes the mature $\gamma\delta$ thymocyte pool. Furthermore, consistent with a requirement for strong TCR signaling, wild-type CD122⁺NK1.1⁺ $\gamma\delta$ thymocytes had high expression of the selection markers CD44, CD73 and CD45RB, which were not detected on CD122⁺ $\gamma\delta$ thymocytes (Fig. 4d). Notably, wild-type CD122⁺NK1.1⁺ $\gamma\delta$ thymocytes had the highest expression of IFN- γ (Fig. 4d), suggesting that the IFN- γ ^{hi} $\gamma\delta$ T cells have a differentiation defect in CD3DH mice. Furthermore, in mixed (wild-type and CD3DH) BM chimeras, CD27⁺CD122⁺NK1.1⁺ $\gamma\delta$ thymocytes were generated exclusively from wild-type progenitors (Fig. 4e). We observed this in both 1:1 and 1:9 (wild-type/CD3DH) chimeras (Fig. 4e), indicating a strong competitive disadvantage of CD3DH precursors along this developmental pathway.

We next aimed to rescue the generation of CD122⁺NK1.1⁺ $\gamma\delta$ thymocytes in CD3DH mice by crosslinking the TCR complex *in vivo*. Intraperitoneal injection of the antibody 17A2, which crosslinks CD3 ϵ dimers, rescued CD122⁺NK1.1⁺ $\gamma\delta$ thymocyte development in CD3DH mice, leading to frequencies similar to that in wild-type mice (Fig. 4f,g). Moreover, wild-type mice treated with 17A2 showed an increase in CD122⁺NK1.1⁺ $\gamma\delta$ thymocytes, as compared to untreated

ARTICLES

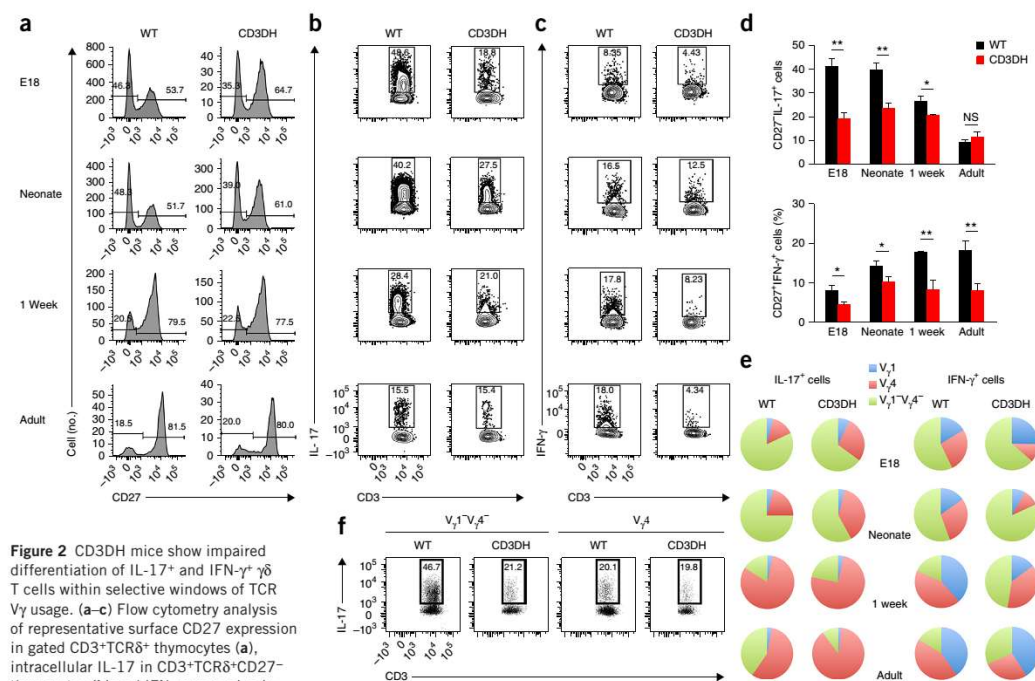


Figure 2 CD3DH mice show impaired differentiation of IL-17⁺ and IFN- γ ⁺ γ δ T cells within selective windows of TCR V γ usage. (a–c) Flow cytometry analysis of representative surface CD27 expression in gated CD3⁺TCR δ ⁺ thymocytes (a), intracellular IL-17 in CD3⁺TCR δ ⁺CD27[−] thymocytes (b) and IFN- γ expression in CD3⁺TCR δ ⁺CD27⁺ thymocytes (c) from wild-type (WT) or CD3DH mice at various developmental stages after stimulation with PMA and ionomycin. Numbers indicate the percentages of cells in the bracketed region. (d) Percentage of CD27[−]IL-17⁺ (top) and CD27⁺IFN- γ ⁺ (bottom) γ δ T cells in WT and CD3DH mice determined as in b and c, respectively. NS, not significant; * P < 0.05; ** P < 0.01 (Student's t -test). Data are mean \pm s.d.; n = 16 E18 embryos, 6 neonates, 5 1-week-old and 10 adult mice. (e) V γ usage by CD27[−]IL-17⁺ or CD27⁺IFN- γ ⁺ γ δ T cells at various developmental stages (n = 7 mice per group), as determined by flow cytometry. (f) Flow cytometry analysis of intracellular IL-17 expression in CD3⁺TCR δ ⁺CD27[−] thymocytes sorted from three pooled E18 WT or CD3DH mice after stimulation with PMA and ionomycin. Numbers in outlined areas or quadrants of flow cytometry plots indicate percentages of cells in each. Data are representative of 2–4 experiments per developmental stage.

© 2016 Nature America, Inc. All rights reserved.

npg

wild-type mice (Fig. 4a,f). These data indicate that strong TCR signaling promotes (and is required for) the development of the IFN- γ ^{hi}CD27⁺CD122⁺NK1.1⁺ γ δ thymocyte subset.

Reduced IFN- γ ⁺ γ δ T cells and cerebral malaria resistance

We next investigated the consequences of reduced γ δ TCR signaling in CD3DH mice on peripheral γ δ T cells. Upon *ex vivo* stimulation with phorbol ester (PMA) and ionomycin, CD3DH splenocytes showed reduced CD27⁺IFN- γ ⁺ but normal CD27[−]IL-17⁺ γ δ T cell frequencies compared to wild-type splenocytes (Fig. 5a,b). In contrast, CD3DH CD4⁺ α β T cells differentiated normally into type 1 helper T (T_H1) cells when activated in the presence of IL-12 (Supplementary Fig. 5), indicating that the IFN- γ defect of CD3DH mice was selective for γ δ T cells. Moreover, CD27⁺CD122⁺NK1.1⁺CD44⁺ γ δ splenocytes were absent in CD3DH mice but not wild-type mice (Fig. 5c–f). We also observed this in competitive wild-type and CD3DH BM chimeras at 1:1 and 1:9 (wild-type/CD3DH) ratios (Fig. 5e).

We next assessed the physiological importance of IFN- γ ⁺ CD27⁺CD122⁺ NK1.1⁺ γ δ T cells in a model of cerebral malaria, which is associated with IFN- γ -dependent pathology and a major contribution from γ δ T cells^{3,39}. We induced experimental cerebral malaria with *Plasmodium berghei* ANKA sporozoites, establishing

liver-stage infection, which precedes the symptomatic blood-stage infection. We observed an abundant IFN- γ ⁺ γ δ T cell population in the spleen at day 5 after infection (blood stage) in wild-type mice that was markedly reduced in CD3DH mice (Fig. 5g), which also showed higher parasitemia (measured as percentage of infected red blood cells) than infected wild-type mice (Fig. 5h). Neurological symptoms appeared in wild-type mice around day 6 after infection and became fatal in all animals by day 7–10 (Fig. 5i). By contrast, γ δ T-cell-deficient (TCR δ -deficient) and most CD3DH mice remained healthy and survived (Fig. 5i). These data demonstrate that IFN- γ ⁺ γ δ T cells make mice highly susceptible to fatal inflammatory syndromes such as severe malaria.

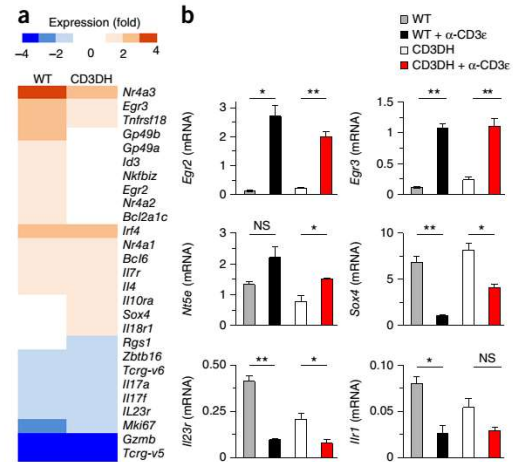
DISCUSSION

The reduced TCR γ δ expression on the surface of γ δ thymocytes in CD3DH mice allowed us to examine a diverse, polyclonal TCR γ δ repertoire, which is highly valuable given the association between specific TCR gene usage and functional differentiation biases²⁶. Our results suggest that distinct developmental γ δ T cell subsets defined by V γ rearrangement and usage have distinct TCR signal strength requirements for differentiation into IFN- γ ⁺ or IL-17⁺ cells.

Figure 3 Transcriptional signatures of TCR signal strength in $\gamma\delta$ thymocytes. (a) Microarray heatmap of differentially expressed genes during ontogeny in sorted $\text{CD3}^+\text{TCR}\delta^+\gamma\delta$ thymocytes from wild-type (WT) and CD3DH mice (>2-fold enriched in adult relative to fetal thymocytes). (b) Real-time reverse transcription PCR analysis of fold expression (normalized to the housekeeping gene *Hprt*) of *Egr2*, *Egr3*, *Nt5e* (encoding CD73), *Sox4*, *Il23r* and *Ilr1* in sorted $\text{CD3}^+\text{TCR}\delta^+\gamma\delta$ thymocytes from WT and CD3DH mice ($n = 3$ per group) before and after 16 h stimulation with $\alpha\text{-CD3e}$ (10 $\mu\text{g/ml}$). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ (Student's *t*-test). Data are mean \pm s.d. Data are representative of two independent experiments.

CD3 δ has been shown to be absent from mouse mature TCR $\gamma\delta$ complexes^{40,41}, which raises the question how it affects surface TCR $\gamma\delta$ expression. As we found no evidence for the presence of CD3 δ on the surface of $\gamma\delta$ thymocytes (data not shown), it is unclear whether CD3 δ transiently participates in intracellular TCR $\gamma\delta$ assembly. It is also possible that changes in the relative intracellular amounts of CD3 chains, as observed in CD3DH mice, could cause abnormal glycosylation of CD3 δ ^{42,43} (data not shown) and/or CD3 γ ⁴⁴, which in turn could impair the assembly and stability of nascent TCR complexes, and ultimately their surface expression and signaling^{44,45}.

TCR signaling strength affects thymic commitment to the $\alpha\beta$ versus $\gamma\delta$ lineages^{23–25}. Consistent with this, CD3DH mice showed reduced numbers of total $\gamma\delta$ thymocytes, including loss of IFN- γ ^{hi} CD122⁺NK1.1⁺ $\gamma\delta$ T cells. The number and frequencies of $\alpha\beta$ T cell subsets, including thymic regulatory (T_{reg}) and invariant NKT (iNKT) cells, was normal in CD3DH mice, although the repertoire of TCR $\alpha\beta$ subpopulations was not assessed. However, the expression of the $\alpha\beta$



TCR was normal in developing CD3DH thymocytes, indicating that the reduction in TCR expression was specific to $\gamma\delta$ thymocytes.

Notably, whereas IL-17 $^+$ V γ 6 $^+$ cells were underrepresented in CD3DH mice, their IL-17 $^+$ V γ 4 $^+$ counterparts were not affected, consistent with distinct developmental requirements for the two IL-17 $^+$ $\gamma\delta$ T cell

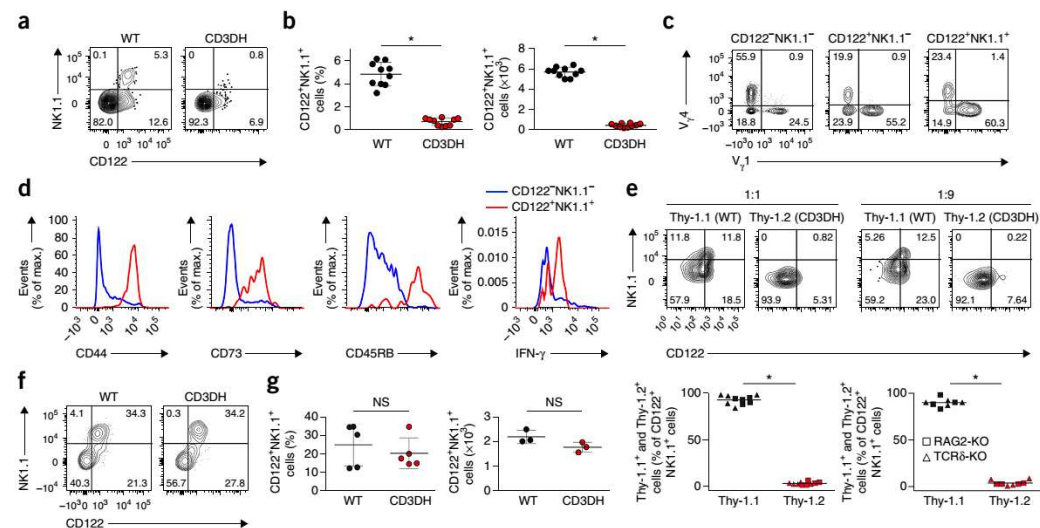


Figure 4 CD3DH mice lack IFN- γ ^{hi}CD122⁺NK1.1⁺ thymocytes, which are rescued by CD3 crosslinking *in vivo*. (a) Flow cytometry analysis of NK1.1 versus CD122 expression in TCR δ^+ CD3 $^+$ CD27 $^+$ thymocytes isolated from adult wild-type (WT) or CD3DH mice ($n = 10$ mice per group). (b) Frequencies (left) and total numbers (right) of TCR δ^+ CD3 $^+$ CD27 $^+$ CD122⁺NK1.1⁺ thymocytes. Each dot represents an individual mouse (10 per group). (c, d) Flow cytometry analysis of V γ 1 versus V γ 4 chain usage (c) and surface CD44, CD73, CD45RB or intracellular IFN- γ production (d) by TCR δ^+ CD3 $^+$ CD27 $^+$ thymocyte subsets from adult WT mice ($n = 5$ per group). Data in a–d are representative of at least three independent experiments. (e) Flow cytometry analysis of NK1.1 versus CD122 expression (top) in Thy-1.1 $^+$ (WT-derived) or Thy-1.2 $^+$ (CD3DH-derived) fractions (bottom) of TCR δ^+ CD3 $^+$ CD27 $^+$ CD122⁺NK1.1⁺ thymocytes from 1:1 or 1:9 mixed BM chimeras. Each symbol indicates one RAG2-deficient (RAG2-KO) or TCR δ -KO mouse. (f, g) Flow cytometry showing representative NK1.1 versus CD122 expression (f) and percentage (g, left) and numbers (g, right) of TCR δ^+ CD3 $^+$ CD27 $^+$ CD122⁺NK1.1⁺ thymocytes in WT or CD3DH mice, 5 d after intraperitoneal injection of $\alpha\text{-CD3}$ 17A2 ($n = 3$ per group). Each dot in g represents an individual mouse. NS, not significant; * $P < 0.01$ (Student's *t*-test); error bars indicate mean \pm s.d. Numbers in outlined areas or quadrants of flow cytometry plots indicate percentages of cells in each.

ARTICLES

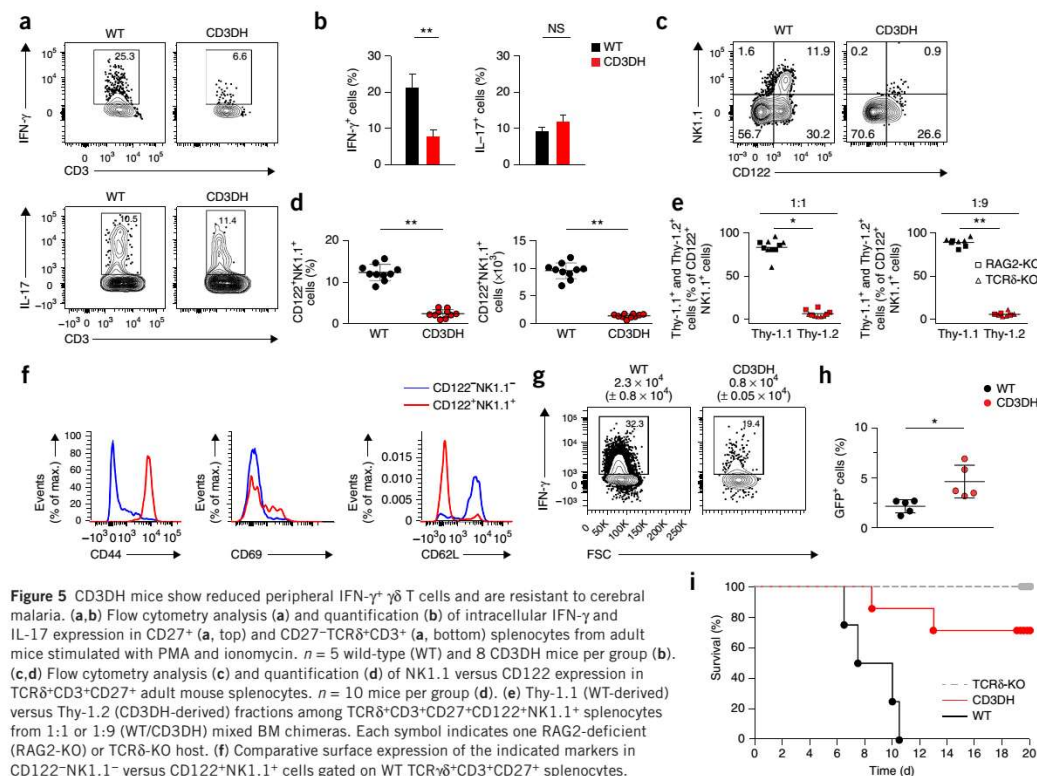


Figure 5 CD3DH mice show reduced peripheral IFN- γ ⁺ $\gamma\delta$ T cells and are resistant to cerebral malaria. (a,b) Flow cytometry analysis (a) and quantification (b) of intracellular IFN- γ and IL-17 expression in CD27⁺ (a, top) and CD27⁻TCR δ ⁺CD3⁺ (a, bottom) splenocytes from adult mice stimulated with PMA and ionomycin. $n = 5$ wild-type (WT) and 8 CD3DH mice per group (b). (c,d) Flow cytometry analysis (c) and quantification (d) of NK1.1 versus CD122 expression in TCR δ ⁺CD3⁺CD27⁺ adult mouse splenocytes. $n = 10$ mice per group (d). (e) Thy-1.1 (WT-derived) versus Thy-1.2 (CD3DH-derived) fractions among TCR δ ⁺CD3⁺CD27⁺CD122⁺NK1.1⁺ splenocytes from 1:1 or 1:9 (WT/CD3DH) mixed BM chimeras. Each symbol indicates one RAG2-deficient (RAG2-KO) or TCR δ -KO host. (f) Comparative surface expression of the indicated markers in CD122⁺NK1.1⁻ versus CD122⁺NK1.1⁺ cells gated on WT TCR δ ⁺CD3⁺CD27⁺ splenocytes. (g,h) Intracellular IFN- γ expression (after PMA and ionomycin stimulation) in TCR δ ⁺CD3⁺CD27⁺ splenocytes (g) and parasitemia as percentage of blood GFP⁺ cells (h, $n = 5$ mice) 5 d after infection with *P. berghei* ANKA sporozoites. Numbers above plots (g) indicate mean \pm s.d. absolute counts of IFN- γ ⁺ $\gamma\delta$ cells. (i) Survival curves of mice infected as in g ($n = 10$ mice in two independent experiments). NS, not significant; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (Student's *t*-test). Data in a–i are representative of three independent experiments. Error bars indicate mean \pm s.d.; dots represent individual mice. Numbers in outlined areas or quadrants of flow cytometry plots indicate percentages of cells in each.

subsets³². V γ 6⁺ thymocytes have been shown to outcompete V γ 4⁺ thymocytes when reconstituting the dermis of $\gamma\delta$ T-cell-deficient mice⁸, and whereas fetal-derived (and thymically programmed) V γ 6⁺ T cells were shown to be resident in the dermis, adult BM-derived V γ 4⁺ T cells seem to depend on extrathymic signals to migrate to the skin. Thus, by differentially controlling tissue homing properties, thymic programming may determine the pathophysiological contributions of discrete $\gamma\delta$ T cell subsets. Consistent with this, V γ 4⁺ T cells represent the major source of IL-17 in psoriasis-like inflammation^{8,32}, as well as in experimental autoimmune encephalomyelitis¹³ and collagen-induced arthritis⁴⁶, whereas V γ 6⁺ T cells are more frequent in *Listeria* infection⁵ and ovarian cancer¹⁸.

The observation that fetal-derived and adult IL-17⁺ $\gamma\delta$ T cells have distinct TCR signaling requirements could not be made with the available (V γ 4-based) transgenic TCR $\gamma\delta$ models and resolves previous controversies on the TCR dependence (or independence) of IL-17⁺ $\gamma\delta$ T cell development^{12,21,22,28}. Namely, our data indicate that V γ 6⁺, but not V γ 4⁺, thymocytes depend on strong TCR signals for functional differentiation, which in turn warrants investigation into their respective ligand engagement requirements.

In addition to ligand engagement, distinct signaling cascades downstream of the TCR $\gamma\delta$ may differentially affect $\gamma\delta$ T cell subsets. It will be important to establish whether TCR $\gamma\delta$ signaling is perceived mostly quantitatively or qualitatively on the basis of the engagement of distinct signaling pathways, such as ERK-MAPK or PI3K-AKT (N. Sumaria, B.S.-S. and D.J.P., unpublished data). Further downstream in cellular programming, our transcriptional analysis of fetal and adult total $\gamma\delta$ thymocytes stages showed that CD3DH $\gamma\delta$ thymocytes efficiently downregulated the IL-17 program but were deficient in upregulating the IFN- γ pathway between fetal and adult stages. Particularly affected were the transcription factors *Egr2*, *Egr3* and *Id3*, which are induced by agonist TCR signaling^{21,47} and may be required to suppress a 'default' ROR γ t-dependent IL-17 program and maximize IFN- γ production in $\gamma\delta$ thymocytes. This would be consistent with both the repression of the IL-17 pathway in V γ 5⁺ DETC development²¹ and the depletion, in CD3DH mice, of V γ 1-biased CD27⁺CD122⁺NK1.1⁺ $\gamma\delta$ T cells, the subset expressing the highest IFN- γ on a per cell basis.

Notably, the transcription factors that control *Irfng* and *Il17a* expression, T-bet and ROR γ t, were normally expressed in CD3DH $\gamma\delta$

T cell subsets, suggesting that the $\gamma\delta$ T cell differentiation phenotype in these mice derives from mechanisms downstream of T-bet or ROR γ t expression. This is in agreement with normal expression of these transcription factors in $\gamma\delta$ thymocytes deficient for the TCR signal transducer Itk²⁸. We therefore propose that a major function of TCR $\gamma\delta$ signaling is to select preprogrammed precursors, which could resemble innate lymphoid cells (ILCs), for differentiation into effector cells making IFN- γ or IL-17. Future studies on the functional similarities and differences between ILC and $\gamma\delta$ T cell subsets may contribute to understanding the evolutionary conservation of these innate-like lymphocytes and their therapeutic potential for infectious or inflammatory diseases and cancer²⁰.

METHODS

Methods and any associated references are available in the online version of the paper.

Accession codes. Gene Expression Omnibus: Microarray data have been deposited under accession code GSE71637.

Note: Any Supplementary Information and Source Data files are available in the online version of the paper.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank K. Serre, J. Martins, N. Schmolka, A. Amorim, V.Z. Luis and M.M. Mota (all at IMM Lisboa); and B. Garcillán, D. de Juan, M. Mazariegos, M. Sanz-Rodríguez and S. Diaz-Castroverde (Complutense University) for help and advice; A. Hayday (King's College London) and P. Pereira (Pasteur Institute) for insightful discussions; and the staff of the animal and flow cytometry facilities at IMM Lisboa and Complutense University for technical assistance. This work was funded by the European Research Council (StG_260352 and CoG_646701 to B.S.-S.); MINECO (SAF2011-24235 and BES-2012-055054 to J.R.R.), CAM (S2010/BMD-2316/2326 to J.R.R.) and the Lair Foundation (2012/0070 to J.R.R.); and FIS P111/02198 and MINECO SAF2014-54708-R to E.F.-M.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

M.M.-R., B.S.-S., E.F.-M., J.R.R. and D.J.P. designed research; M.M.-R., J.C.R., A.R.G., N.G.-S. and A.P. performed experiments; B.S.-S., E.F.-M. and J.R.R. supervised research and wrote the manuscript.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

Reprints and permissions information is available online at <http://www.nature.com/reprints/index.html>.

- Wang, T. *et al.* IFN- γ -producing $\gamma\delta$ T cells help control murine West Nile virus infection. *J. Immunol.* **171**, 2524–2531 (2003).
- Gao, Y. *et al.* $\gamma\delta$ T cells provide an early source of interferon- γ in tumor immunity. *J. Exp. Med.* **198**, 433–442 (2003).
- Jagannathan, P. *et al.* Loss and dysfunction of V δ 2⁺ $\gamma\delta$ T cells are associated with clinical tolerance to malaria. *Sci. Transl. Med.* **6**, 251ra117 (2014).
- Cho, J.S. *et al.* IL-17 is essential for host defense against cutaneous *Staphylococcus aureus* infection in mice. *J. Clin. Invest.* **120**, 1762–1773 (2010).
- Sheridan, B.S. *et al.* $\gamma\delta$ T cells exhibit multifunctional and protective memory in intestinal tissues. *Immunity* **39**, 184–195 (2013).
- Cai, Y. *et al.* Pivotal role of dermal IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells in skin inflammation. *Immunity* **35**, 596–610 (2011).
- Pantelyushin, S. *et al.* Ror γ t⁺ innate lymphocytes and $\gamma\delta$ T cells initiate psoriasiform plaque formation in mice. *J. Clin. Invest.* **122**, 2252–2256 (2012).
- Cai, Y. *et al.* Differential developmental requirement and peripheral regulation for dermal V δ 4 and V δ 6T17 cells in health and inflammation. *Nat. Commun.* **5**, 3986 (2014).
- Park, S.G. *et al.* T regulatory cells maintain intestinal homeostasis by suppressing $\gamma\delta$ T cells. *Immunity* **33**, 791–803 (2010).
- Romani, L. *et al.* Defective tryptophan catabolism underlies inflammation in mouse chronic granulomatous disease. *Nature* **451**, 211–215 (2008).
- Shichita, T. *et al.* Pivotal role of cerebral interleukin-17-producing $\gamma\delta$ T cells in the delayed phase of ischemic brain injury. *Nat. Med.* **15**, 946–950 (2009).
- Jensen, K.D. *et al.* Thymic selection determines $\gamma\delta$ T cell effector fate: antigen-naïve cells make interleukin-17 and antigen-experienced cells make interferon- γ . *Immunity* **29**, 90–100 (2008).
- Sutton, C.E. *et al.* Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from $\gamma\delta$ T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity* **31**, 331–341 (2009).

- Petermann, F. *et al.* $\gamma\delta$ T cells enhance autoimmunity by restraining regulatory T cell responses via an interleukin-23-dependent mechanism. *Immunity* **33**, 351–363 (2010).
- Prinz, I., Silva-Santos, B. & Pennington, D.J. Functional development of $\gamma\delta$ T cells. *Eur. J. Immunol.* **43**, 1988–1994 (2013).
- Ribot, J.C. *et al.* CD27 is a thymic determinant of the balance between interferon- γ - and interleukin 17-producing $\gamma\delta$ T cell subsets. *Nat. Immunol.* **10**, 427–436 (2009).
- Haas, J.D. *et al.* CCR6 and NK1.1 distinguish between IL-17A and IFN- γ -producing $\gamma\delta$ effector T cells. *Eur. J. Immunol.* **39**, 3488–3497 (2009).
- Rei, M. *et al.* Murine CD27⁺ V δ 6⁺ $\gamma\delta$ T cells producing IL-17A promote ovarian cancer growth via mobilization of protumor small peritoneal macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, E3562–E3570 (2014).
- Wu, P. *et al.* $\gamma\delta$ T17 cells promote the accumulation and expansion of myeloid-derived suppressor cells in human colorectal cancer. *Immunity* **40**, 785–800 (2014).
- Silva-Santos, B., Serre, K. & Norell, H. $\gamma\delta$ T cells in cancer. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 683–691 (2015).
- Turchinovich, G. & Hayday, A.C. Skint-1 identifies a common molecular mechanism for the development of interferon- γ -secreting versus interleukin-17-secreting $\gamma\delta$ T cells. *Immunity* **35**, 59–68 (2011).
- Wencker, M. *et al.* Innate-like T cells straddle innate and adaptive immunity by altering antigen-receptor responsiveness. *Nat. Immunol.* **15**, 80–87 (2014).
- Ciofani, M. & Zúñiga-Pflücker, J.C. Determining $\gamma\delta$ versus $\alpha\beta$ T cell development. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 657–663 (2010).
- Haks, M.C. *et al.* Attenuation of $\gamma\delta$ TCR signaling efficiently diverts thymocytes to the $\alpha\beta$ lineage. *Immunity* **22**, 595–606 (2005).
- Hayes, S.M., Li, L. & Love, P.E. TCR signal strength influences $\alpha\beta/\gamma\delta$ lineage fate. *Immunity* **22**, 583–593 (2005).
- O'Brien, R.L. & Born, W.K. $\gamma\delta$ T cell subsets: a link between TCR and function? *Semin. Immunol.* **22**, 193–198 (2010).
- Narayan, K. *et al.* Immunological Genome Project Consortium. Intrathymic programming of effector fates in three molecularly distinct $\gamma\delta$ T cell subtypes. *Nat. Immunol.* **13**, 511–518 (2012).
- Malhotra, N. *et al.* Immunological Genome Project Consortium. A network of high-mobility group box transcription factors programs innate interleukin-17 production. *Immunity* **38**, 681–693 (2013).
- Dave, V.P. *et al.* CD3 δ deficiency arrests development of the $\alpha\beta$ but not the $\gamma\delta$ T cell lineage. *EMBO J.* **16**, 1360–1370 (1997).
- Coffey, F. *et al.* The TCR ligand-inducible expression of CD73 marks $\gamma\delta$ lineage commitment and a metastable intermediate in effector specification. *J. Exp. Med.* **211**, 329–343 (2014).
- Azzam, H.S. *et al.* CD5 expression is developmentally regulated by T cell receptor (TCR) signals and TCR avidity. *J. Exp. Med.* **188**, 2301–2311 (1998).
- Haas, J.D. *et al.* Development of interleukin-17-producing $\gamma\delta$ T cells is restricted to a functional embryonic wave. *Immunity* **37**, 48–59 (2012).
- Schmolka, N. *et al.* Epigenetic and transcriptional signatures of stable versus plastic differentiation of proinflammatory $\gamma\delta$ T cell subsets. *Nat. Immunol.* **14**, 1093–1100 (2013).
- Schmolka, N., Wencker, M., Hayday, A.C. & Silva-Santos, B. Epigenetic and transcriptional regulation of $\gamma\delta$ T cell differentiation: programming cells for responses in time and space. *Semin. Immunol.* **27**, 19–25 (2015).
- Silva-Santos, B., Pennington, D.J. & Hayday, A.C. Lymphotoxin-mediated regulation of $\gamma\delta$ cell differentiation by $\alpha\beta$ T cell progenitors. *Science* **307**, 925–928 (2005).
- Kannan, Y. *et al.* IxR β augments IL-12- and IL-18-mediated IFN- γ production in human NK cells. *Blood* **117**, 2855–2863 (2011).
- Gu, X. *et al.* The gp49B1 inhibitory receptor regulates the IFN- γ responses of T cells and NK cells. *J. Immunol.* **170**, 4095–4101 (2003).
- Ribot, J.C. *et al.* Cutting edge: adaptive versus innate receptor signals selectively control the pool sizes of murine IFN- γ - or IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells upon infection. *J. Immunol.* **185**, 6421–6425 (2010).
- D'Ombria, M.C., Hansen, D.S., Simpson, K.M. & Schofield, L. $\gamma\delta$ -T cells expressing NK receptors predominate over NK cells and conventional T cells in the innate IFN- γ response to *Plasmodium falciparum* malaria. *Eur. J. Immunol.* **37**, 1864–1873 (2007).
- Hayes, S.M. & Love, P.E. Stoichiometry of the murine $\gamma\delta$ T cell receptor. *J. Exp. Med.* **203**, 47–52 (2006).
- Siegers, G.M. *et al.* Different composition of the human and the mouse $\gamma\delta$ T cell receptor explains different phenotypes of CD3 γ and CD3 δ immunodeficiencies. *J. Exp. Med.* **204**, 2537–2544 (2007).
- Zapata, D.A. *et al.* Conformational and biochemical differences in the TCR-CD3 complex of CD8⁺ versus CD4⁺ mature lymphocytes revealed in the absence of CD3 γ . *J. Biol. Chem.* **274**, 35119–35128 (1999).
- Fernández-Malavé, E. *et al.* Overlapping functions of human CD3 δ and mouse CD3 γ in $\alpha\beta$ T-cell development revealed in a humanized CD3 γ -mouse. *Blood* **108**, 3420–3427 (2006).
- Hayes, S.M. *et al.* Activation-induced modification in the CD3 complex of the $\gamma\delta$ T cell receptor. *J. Exp. Med.* **196**, 1355–1361 (2002).
- Hayes, S.M. & Love, P.E. Distinct structure and signaling potential of the $\gamma\delta$ TCR complex. *Immunity* **16**, 827–838 (2002).
- Roark, C.L. *et al.* Exacerbation of collagen-induced arthritis by oligoclonal, IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells. *J. Immunol.* **179**, 5576–5583 (2007).
- Seiler, M.P. *et al.* Elevated and sustained expression of the transcription factors Egr1 and Egr2 controls NKT lineage differentiation in response to TCR signaling. *Nat. Immunol.* **13**, 264–271 (2012).

ONLINE METHODS

Mice. Adult mice were used at 4–8 weeks of age. Embryos were obtained by the setting up of timed pregnancies. C57BL/6 (wild-type (WT)) mice were from Charles River Laboratories. *Cd3g*^{−/−} mice have been described⁴⁸ and were a gift from D. Kappes (Fox Chase Cancer Center). *Cd3δ*^{−/−} have been described²⁹ and were a gift from I. Luescher (Ludwig Institute for Cancer Research). CD3DH mice were obtained by crossing *Cd3g*^{−/−} males with *Cd3δ*^{−/−} females. For the studies, both males and females were used. Mice were bred and maintained in the pathogen-free animal facilities of the Instituto de Medicina Molecular (Lisbon) and Animalario Universidad Complutense (Madrid). All experiments involving animals were done in compliance with the relevant laws and institutional guidelines. Experimental procedures were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of Universidad Complutense and Comunidad de Madrid, and by the institutional animal welfare body (ORBEA-IMM) and by the DGAV (Portuguese competent authority for animal protection), all in accordance with Directive 2010/63/EU.

Bone marrow chimeras. *Rag2*^{−/−} or *Tcrd*^{−/−} mice were lethally irradiated (900 rad), and the next day injected intravenously with a total of 10⁷ whole bone marrow cells of mixed (1:1 or 1:9) WT (Thy-1.1) and CD3DH (Thy-1.2) origin. Chimeras were given antibiotic-containing water (2% Bactrim; Roche) for the first 4 weeks after irradiation. The hematopoietic compartment was allowed to reconstitute for 6 weeks before organs were harvested for flow cytometry analysis.

Cell preparations. Thymi, lymph nodes and spleens were homogenized and washed in RPMI medium containing 10% (vol/vol) FCS. Splenocytes were depleted from erythrocytes using the Red Blood Cell Lysis buffer 1× (BioLegend).

Monoclonal antibodies. All antibodies used are described in Supplementary Table 1.

Flow cytometry and cell sorting. For cell surface staining, thymocytes, erythrocyte-depleted splenocytes or lymph node cells were incubated for 30 min with saturating concentrations of monoclonal antibodies (mAbs) (Supplementary Table 1). For intracellular cytokine staining, cells were stimulated with PMA (50 ng/mL) and ionomycin (1 μg/mL), in the presence of Brefeldin A (10 μg/mL) (all from Sigma) for 4 h at 37 °C. Cells were stained for the identified above cell surface markers, fixed 30 min at 4 °C and permeabilized with the Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer set (eBioscience) in the presence of anti-CD16/CD32 (93) (eBioscience) for 15 min at 4 °C, and finally incubated for 1 h at room temperature with identified above cytokine-specific antibodies in permeabilization buffer. Samples were acquired using FACSFortessa (BD Biosciences). Data were analyzed using FlowJo software (Tree Star). Live indicated subsets were electronically sorted when indicated using FACSARIA (BD Biosciences).

Cell culture. For early activation markers, cells were incubated for 24 h on plate-bound anti-CD3ε (10 ng/mL) and analyzed by flow cytometry. For phosphorylated molecules downstream of TCR and isotype-matched

control antibody, sorted lymph node cells were stimulated for 5 min with soluble anti-CD3ε (10 μg/mL) then fixed for 30 min at 4 °C and permeabilized with the Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer set (eBioscience) in the presence of anti-CD16/CD32 Fc Block (93) (eBioscience) for 30 min at room temperature and finally incubated for 1 h at room temperature with anti-p-ERK in permeabilization buffer. For T_H1 cell polarization, CD4⁺ αβ T cells were isolated by flow cytometry and incubated for 4 d on plate-bound anti-CD3ε and anti-CD28 (5 ng/mL each). When indicated (T_H1 cocktail), the following cytokines and neutralizing antibodies were added to the culture milieu: IL-2 (10 ng/mL; Preprotech), IL-12 (50 ng/mL; Preprotech) and anti-IL-4 (11B11) (10 μg/mL; eBioscience).

Malaria infection. Mice were infected as described⁴⁹.

RNA isolation, cDNA production and real-time PCR. Total RNA was extracted using the RNeasy Mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Concentration and purity were determined using the NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific). Total RNA was reverse transcribed into cDNA using a Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis kit (Roche). Quantitative real-time PCR was performed on ViiA 7 Real-Time PCR system (Applied Biosystems; Life Technologies). Primers were either designed manually or by the Universal ProbeLibrary Assay Design Center (Roche). Sequences are available upon request. Analysis of quantitative PCR results was performed using the ViiA 7 software v1.2 (Applied Biosystems; Life Technologies).

Microarray. All microarray data analysis was done with R and several packages available from CRAN⁵⁰ and Bioconductor⁵¹. The raw data (CEL files) were normalized and summarized with the Robust MultiArray Average method implemented in the 'oligo' package⁵². Variations in gene expression levels were determined using 'limma' package⁵³ and only genes with fold-change >2 were considered for downstream analysis.

Statistical analysis. The statistical significance of differences between populations was assessed with the Student's *t*-test; *P* < 0.05 was considered significant. Mouse sample sizes were chosen to ensure significance of *t*-test. No mice were excluded. No randomization or blinding was performed. Data met normal distribution with similar variance between groups.

48. Haks, M.C., Krimpenfort, P., Borst, J. & Kruisbeek, A.M. The CD3γ chain is essential for development of both the TCRαβ and TCRγδ lineages. *EMBO J.* **17**, 1871–1882 (1998).

49. Liehl, P. *et al.* Host-cell sensors for *Plasmodium* activate innate immunity against liver-stage infection. *Nat. Med.* **20**, 47–53 (2014).

50. R Development Core Team. R: a language and environment for statistical computing (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2011).

51. Huber, W. *et al.* Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. *Nat. Methods* **12**, 115–121 (2015).

52. Carvalho, B.S. & Irizarry, R.A. A framework for oligonucleotide microarray preprocessing. *Bioinformatics* **26**, 2363–2367 (2010).

53. Ritchie, M.E. *et al.* limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* **43**, e47 (2015).